

N^o D'ORDRE :
26

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

A. PHILIPPE LASSEUR

Ancien élève de l'École nationale d'Agriculture de Grignon
Préparateur à la Station Agronomique de Nancy
Licencié ès sciences naturelles

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE *Bacillus chlororaphis* G. ET S.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le novembre 1911 devant la Commission d'examen

MM. LE MONNIER	<i>Président</i>
PETIT	} <i>Examineurs</i>
CUÉNOT	
NICKLÈS	

NANCY

IMPRIMERIE BERGER-LEVRAULT

18, RUE DES GLACIS, 18

1911



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547427_0016

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE

Bacillus Chlororaphis G. ET S.

UNIVERSITÉ DE NANCY

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. FLOQUET, *, I U

Assesseur

M. PETIT, *, I U, D

Doyen honoraire

M. GRANDEAU, C *, I U, C D

Professeurs honoraire

MM. GRANDEAU, C *, I U, C D ; FRIANT, *, I U ; HALLER, O *, I U ;
BLONDLOT, O *, I U ; CARTAN, *, I U ; BLAISE, I U

Chargé de cours honoraire

M. MILLOT, I U

Professeurs

MM. LE MONNIER, *, I U, D.	<i>Botanique.</i>
FLOQUET, *, I U	<i>Analyse.</i>
THOULET, *, I U	<i>Géologie et minéralogie.</i>
MOLK, *, I U	<i>Mécanique rationnelle.</i>
CUENOT, I U, O D	<i>Zoologie.</i>
GUNTZ, *, I U	<i>Chimie minérale.</i>
VOGT, I U	<i>Mathématiques appliquées.</i>
PETIT, *, I U, D	<i>Chimie agricole.</i>
MULLER, I U	<i>Chimie physique et électrochimie.</i>
NICKLÈS, *, I U	<i>Géologie.</i>
MINGUIN, I U, D	<i>Chimie.</i>
GUTTON, I U	<i>Physique.</i>
ROTHÉ, I U	<i>Physique.</i>
GRIGNARD, I U	<i>Chimie organique.</i>
GUYOT, I U	<i>Chimie appliquée à la teinture et à l'impression.</i>
WAHL, A U	<i>Chimie industrielle.</i>
HUSSON, A U	<i>Calcul différentiel et intégral.</i>

Professeurs adjoints

MM. GAIN, I U	<i>Botanique.</i>
BOUIN, I U, D	<i>Zoologie appliquée.</i>

Maîtres de conférences

MM. MAUDUIT, I U	<i>Électrotechnique.</i>
REBOUL, A U	<i>Physique.</i>

Directeurs de laboratoire

MM. HAHN, A U	<i>Laboratoire de mécanique appliquée.</i>
WENCELIUS.	<i>Laboratoire d'analyses industrielles.</i>

Chargé d'un cours complémentaire

M. MARSAL, I U	<i>Météorologie.</i>
--------------------------	----------------------

Secrétaire

M. ROVEL, I U.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

A. PHILIPPE LASSEUR

Ancien élève de l'École nationale d'Agriculture de Grignon

Préparateur à la Station Agronomique de Nancy

Licencié ès sciences naturelles

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE *Bacillus chlororaphis* G. ET S.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le novembre 1911 devant la Commission d'examen

MM. LE MONNIER..... *Président*

PETIT
CUÉNOT
NICKLÈS..... } *Examineurs*



NANCY

IMPRIMERIE BERGER-LEVRAULT

18, RUE DES GLACIS, 18

1911

A MESSIEURS

G. LE MONNIER

PROFESSEUR DE BOTANIQUE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE NANCY

P. PETIT

PROFESSEUR DE CHIMIE AGRICOLE

DIRECTEUR DE L'ÉCOLE DE BRASSERIE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE NANCY

*Hommage
de respectueuse reconnaissance*

PH. LASSEUR

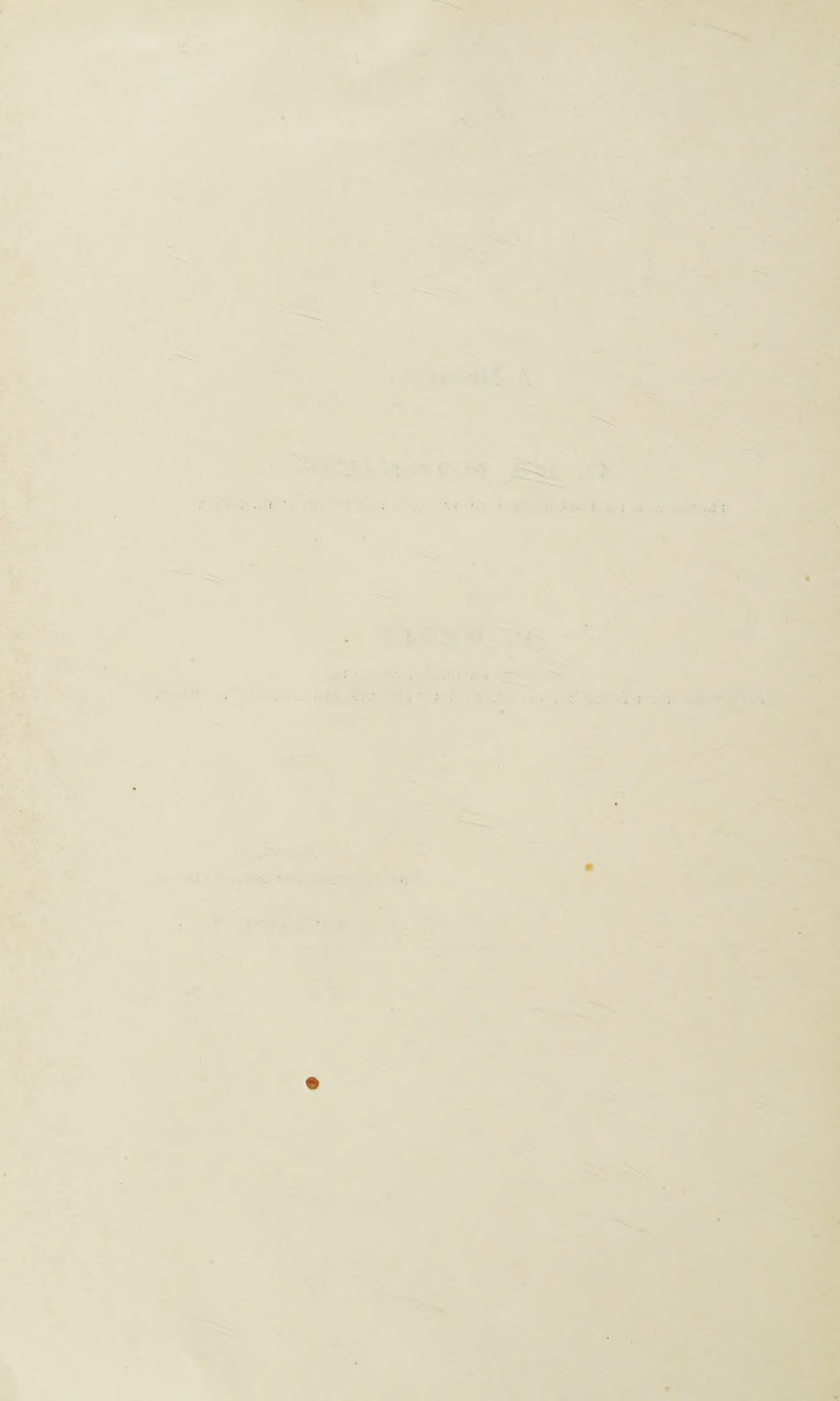


TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.	11
HISTORIQUE.	14

PREMIÈRE PARTIE

Vie libre et dans les milieux non chimiquement définis

HABITAT.	17
MORPHOLOGIE.	19
<i>Formes.</i>	19
<i>Groupement et arrangement</i>	25
<i>Coloration naturelle.</i>	25
<i>Coloration par les réactifs.</i>	27
<i>Structure.</i>	27
<i>Motilité.</i>	28
<i>Flagella</i>	29
<i>Formes de résistance. — Spores.</i>	30
CARACTÈRES DE CULTURE	33
<i>Caractères généraux des cultures</i>	33
Vitalité dans les cultures.	33
Température	34
<i>Cultures sur les milieux usuels.</i>	35
Gélatine	35
Gélose	37
Gélose asparagine	38
Pomme de terre.	39
Dahlia	39
Bouillon simple, bouillon peptoné, bouillon peptoné glucosé, solution de peptone.	40
<i>Cultures sur milieux spéciaux.</i>	42
Action sur le lait.	42

	Pages
Action sur l'albumine cuite.	43
Recherche de l'indol et du phénol.	44
Action sur les nitrates.	44

DEUXIÈME PARTIE

Cultures en milieux synthétiques

CULTURES INCOLORES	48
ÉTUDE DE LA FONCTION FLUORESCIGÈNE	49
<i>Bacillus chlororaphis</i> semble-t-il se comporter comme <i>Bacillus pyocyaneus</i> ?	52
CONDITIONS DE PRODUCTION DE LA CHLORORAPHINE.	56
<i>Milieu de culture (milieu synthétique type)</i>	56
Aliment azoté.	59
Aliment hydrocarboné.	59
Éléments minéraux.	60
<i>Cultures de diverses bactéries chromogènes en milieu synthétique type</i>	66
<i>Action de la lumière et de la température</i>	67
<i>Influence de l'oxygène et de différents gaz</i>	68
<i>Transformation de l'aliment organique dans le milieu synthétique type</i>	76
<i>Milieux de substitution. Transformation de l'aliment azoté et carboné</i>	79
Aliment azoté.	79
Aliment hydrocarboné.	81
<i>Réaction du milieu à l'apparition des cristaux</i>	84
<i>Influence des bases et des produits de diverses fermentations de l'asparagine</i>	86
<i>Influence des acides</i>	90
<i>Influence de la semence</i>	92
<i>Mécanisme de formation des cristaux verts</i>	95
<i>Xanthoraphine</i>	101
Extraction.	101
Propriétés	102
<i>Brunissement des cultures</i>	103
CHLORORAPHINE ET OXYCHLORORAPHINE	106
Formes cristallines dans les cultures.	106
Examen microscopique des cristaux.	107
Extraction de la chlororaphine.	108
Purification.	108
Obtention de l'oxychlororaphine	111
Propriétés de la chlororaphine	111-113
Propriétés physiques de l'oxychlororaphine.	113
Composition	115
Propriétés chimiques	118
Action physiologique.	121
Résumé.	121

TROISIÈME PARTIE

Pathogénie

	Pages
INOCULATION A CERTAINS ANIMAUX A TEMPÉRATURE CONSTANTE. . .	124
<i>Inoculation à la Souris</i>	124
Étude générale sur l'Inoculation	124
Variation expérimentale du pouvoir chromogène	127
<i>Inoculation au Cobaye</i>	130
Toxines solubles.	131
Agglutinines	132
INOCULATION A CERTAINS ANIMAUX D'EAU DOUCE.	133
<i>Inoculation à l'Écrevisse</i>	133
<i>Inoculation aux Poissons</i>	133
<i>Inoculation à la Grenouille</i>	134
<i>Signification du Bacillus chlororaphis dans les eaux d'alimentation</i> . . .	139
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	137
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.	139
EXPLICATION DE LA PLANCHE	148

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE

Bacillus Chlororaphis G. ET S.

INTRODUCTION

Le présent travail a pour objet l'étude, aussi détaillée que j'ai pu la faire, d'une bactérie remarquable par la propriété qu'elle possède de donner naissance à une substance verte cristallisable.

J'admets que le microorganisme que j'ai étudié appartient à l'espèce que MM. GUIGNARD et SAUVAGEAU ont fait connaître sous le nom de *Bacillus chlororaphis*. Mon premier soin sera de justifier cette identification, à laquelle on pourrait objecter quelques divergences entre la forme que j'ai observée et celle qu'ont eue sous les yeux les auteurs de l'espèce.

Si l'identification des espèces est une question souvent controversée à propos des animaux et des végétaux supérieurs dont l'organisation compliquée offre à l'observateur de nombreux points de repère, elle est encore bien autrement délicate quand il s'agit d'organismes inférieurs. Non seulement la simplicité de ces êtres leur impose une ressemblance souvent trompeuse, mais, en outre, leur variabilité suivant les conditions de milieux risque de faire méconnaître l'identité de deux formes dérivées l'une de l'autre.

Pour parer à ces difficultés, les bactériologistes ont cherché à s'entendre sur une méthode d'étude, soumettant les espèces étudiées à une série d'épreuves déterminées de manière à rendre comparables les données de différents observateurs. Des plans

d'étude de ce genre ont été dressés par le Comité américain (1898) et par L. GRIMBERT (1903). Ces deux listes des épreuves à faire subir à une bactérie pour mettre en évidence ses diverses fonctions se complètent mutuellement. Aussi, pour l'étude de *B. chlororaphis*, ai-je adopté une marche méthodique basée sur les indications données par le Comité américain et sur celles fournies par GRIMBERT.

Les observations faites en m'inspirant des méthodes préconisées par les auteurs cités plus haut sont exposées dans les première et troisième parties de mon travail.

Anticipant sur l'exposé de ces recherches, je vais indiquer tout de suite comment elles m'ont conduit à appliquer à mon bacille le nom de *Bacillus chlororaphis* (GUIGNARD et SAUVAGEAU). GUIGNARD et SAUVAGEAU, dans leur brève note destinée seulement à signaler une espèce remarquable, n'ont pas exposé en détail le mode de culture qu'ils ont adopté. Ils ont probablement employé un milieu que je n'ai pas réalisé, et cela suffirait à expliquer les petites divergences qui séparent leur description de la mienne en ce qui concerne la taille et la forme des organismes.

Cette explication ne rendrait pas compte d'une différence beaucoup plus grave, à savoir la production facile des spores dans leurs cultures, leur absence totale dans les miennes. Il faut bien admettre qu'il existe, de ce chef, une différence entre leur microbe et le mien. Cette différence est-elle d'ordre spécifique? Je ne le crois pas. M. le professeur GUIGNARD, que j'ai consulté à ce sujet, est du même avis. On sait, en effet, par l'exemple de *B. anthracis*, que, dans une espèce habituellement capable de sporuler, il peut exister des races privées de cette fonction. Or, toutes mes cultures dérivent d'une seule et unique colonie originaire. Il est donc très admissible que le hasard m'ait fait tomber sur une race *asporogène*, tandis que GUIGNARD et SAUVAGEAU auraient rencontré le type *sporogène* normal.

La raison prépondérante pour réunir les deux formes, c'est l'existence de cette fonction chromogène si remarquable qui a attiré l'attention des auteurs de l'espèce et qui ne se rencontre chez aucune autre.

J'ai cherché à préciser tout ce qui concerne cette fonction : les conditions les plus favorables à la production des cristaux verts, leur mode de formation, leurs propriétés chimiques, leur composition. C'est là l'objet de la seconde partie de mon mémoire.

Enfin, dans une troisième partie, j'ai mis en évidence le rôle pathogène que *B. chlororaphis* peut exercer sur certains animaux.

Une partie de ce travail a été faite au laboratoire de bactériologie de la Station agronomique de Nancy. Je remercie M. le Directeur de la Station agronomique d'avoir bien voulu mettre à ma disposition un matériel complet de bactériologie. Je dois ajouter que, dans différents laboratoires de la Faculté des Sciences et de la Faculté de Médecine, j'ai trouvé les ressources, la documentation et la direction qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

J'adresse un souvenir reconnaissant à la mémoire de M. Arth, le regretté Directeur de l'Institut chimique, qui m'avait ouvert les portes de ce bel établissement scientifique où j'ai trouvé le meilleur accueil.

M. le professeur Le Monnier a suivi pas à pas mes recherches; en des circonstances difficiles il m'a donné des marques de profonde bienveillance qui ont été pour moi un véritable appui moral.

M. le professeur Petit m'a prodigué ses savants conseils qui m'ont été d'un précieux secours dans les recherches d'ordre chimique que comporte mon travail. Aussi en dédiant ma thèse à ces deux savants je ne fais que leur témoigner une faible partie de la reconnaissance que je leur dois.

Je ne saurais trop non plus remercier ici MM. les professeurs Cuénot et Vuillemin. M. Cuénot, par ses magistrales leçons de Biologie, m'a ouvert des horizons nouveaux; de plus, lors de mes premières publications, ses judicieux conseils ne m'ont jamais fait défaut. M. Vuillemin a bien voulu m'ouvrir son laboratoire et me faire bénéficier de sa science. Il a examiné mes préparations et contrôlé l'interprétation que j'en donnais.

M. le Dr G. Thiry, Chef du Laboratoire de bactériologie des cliniques de l'Université de Nancy, et M. Mercier, Chef des tra-

vau de Zoologie à la Faculté des Sciences m'ont, chacun dans leur partie, initié à la technique et ont mis à ma disposition leur profonde érudition. Je garderai des années de travail passées dans leurs laboratoires le meilleur souvenir.

M. le Dr Th. Guilloz, professeur adjoint à la Faculté de Médecine, participe amplement à mes remerciements.

Que MM. Willemain et Nicolas, Chefs de travaux à l'Institut chimique, me permettent de leur présenter mes remerciements les plus sincères; bien souvent j'ai mis à contribution leurs connaissances techniques aussi inépuisables que leur complaisance.

A tous ceux qui m'ont facilité cette étude, j'adresse l'expression de ma profonde reconnaissance.

HISTORIQUE

L'historique de *Bacillus chlororaphis* (G. et S.) ne saurait être bien long. Découvert en 1894, il n'a été depuis cette époque que signalé par différents auteurs, sans avoir jamais fait l'objet d'une étude suivie.

Dans une courte note, GUIGNARD et SAUVAGEAU (1894) ont indiqué quelques caractères de *B. chlororaphis*. D'après eux, c'est un microorganisme incolore de 1^μ,5 sur 0^μ,8 qui donne des spores après cinq à six jours. Les cristaux n'apparaissent dans les milieux de culture que dans des conditions déterminées, leur production est influencée par des changements, même légers, du milieu nutritif. Les cultures en bouillon et sur gélatine sont fluorescentes, le Bacille coagule le lait, qui devient très alcalin et dégage une odeur aromatique. Dans chacune de ces cultures, on peut observer la production de cristaux. Il se développe sur carotte et pomme de terre en donnant des formes cristallines, tandis qu'il ne fait que colorer le tubercule du dahlia en vert bleuâtre.

Les aiguilles vertes sont insolubles dans l'eau et les dissolvants neutres; l'alcool absolu bouillant seul les dissout assez bien, mais

la faible quantité de substance pure que les auteurs ont pu retirer des cultures ne leur a pas permis de l'obtenir cristallisée à nouveau. L'acide acétique et les acides minéraux décolorent et dissolvent les cristaux.

De délicates réactions microscopiques donnent à penser que la substance verte est de nature basique; la forme cristalline, les quelques propriétés en présence des acides les amenèrent à la rapprocher de la tyrosine, hypothèse qu'ils ne purent soutenir à la suite de recherches ultérieures.

G. THIRY (1900), dans sa remarquable étude sur le *Bacille polychrome* et l'*Actinomyces mordoré*, fait remarquer que ce dernier microorganisme, cultivé depuis plus de quatre ans, donne encore des cristaux, tandis que le *B. chlororaphis*, dont il a pu observer quatre types d'origines différentes, paraît perdre cette propriété après quelques cultures.

JIROU (1901) a étudié quatorze bacilles fluorescents et parmi ceux-ci le *B. chlororaphis*. Pour lui ce bacille prend irrégulièrement le gram, ne pousse plus à 37° C. et ne donne plus de fluorescence à 32° C. Il coagule le lait lentement sans le peptoniser, réduit les nitrates en nitrites, ne fait fermenter ni l'urée, ni la glycérine, ni les sucres, et n'invertit pas le saccharose.

Bacillus chlororaphis a encore été isolé à plusieurs reprises d'eaux de puits et de rivière par MACÉ (1904), qui émet l'hypothèse que le pigment véritable ne fait peut-être qu'imprégner des cristaux de composés amidés ou protéiques.

Si cette bactérie chromogène tout à fait remarquable ne fut pas plus étudiée, cela tient certainement à la grande difficulté qu'avaient les opérateurs de lui conserver sa fonction.

Depuis plus de quatre ans, je cultive un type sans que cette propriété ait sensiblement diminué; je dirai même qu'elle semble plutôt avoir augmenté par suite des cultures en milieu synthétique.

PREMIÈRE PARTIE

VIE LIBRE ET DANS LES MILIEUX NON CHIMIQUEMENT DÉFINIS

HABITAT

Le fait que GUIGNARD et SAUVAGEAU ont isolé *B. chlororaphis* de cadavres de Vers blancs permet-il de considérer ce Micro-organisme comme parasite, commensal ou symbiote de ces larves? Je ne le crois pas, car les deux savants auxquels la bactériologie est redevable de la découverte d'une si belle espèce chromogène n'ont pas précisé, dans leur travail, de quelle partie des cadavres ils ont isolé leur microbe. De plus, les types de *B. chlororaphis* observés jusqu'à ce jour ont été, le plus souvent, rencontrés dans les eaux. En effet, G. THIRY a pu observer quatre fois *B. chlororaphis*; or, trois types provenaient d'eaux potables ou impures, le quatrième avait été isolé par SCHMIDT au Laboratoire de BRUNOTTE. Croyant que le Bacille avait été isolé par hasard de Sphaignes des Vosges, BRUNOTTE m'engagea à le rechercher dans un certain nombre d'échantillons qu'il mit à ma disposition, mais ces recherches ne furent couronnées d'aucun succès.

MACÉ (1904) a rencontré *B. chlororaphis* dans l'eau de puits ou de rivière et BONJEAN classe ce Microorganisme parmi les bactéries de l'eau, bien qu'il l'ait assez rarement rencontré.

Le type que j'étudie a été isolé de l'eau d'une source de Vigneulles (1). Un an après la première constatation, j'ai réussi

(1) Vigneulles, petite localité située près de Rosières-aux-Salines (Meurthe-et-Moselle). Origine géologique : keuper moyen (grès keupériens).

à l'isoler de nouveau de la même source. Ce deuxième type ne différa en rien du premier et, pour ce motif, j'ai cessé de le cultiver. Depuis, il m'a été impossible de réisoler *B. chlororaphis* de l'eau de la source de Vigneulles. Je l'ai recherché également dans deux cents eaux soumises à l'examen bactériologique. Une seule des eaux ensemencées montra des colonies de *B. chlororaphis*, mais comme, dans le même temps, des cultures en grands ballons étaient journellement filtrées et les filtrats jetés à l'évier, il n'est pas certain qu'il s'agisse là d'un isolement nouveau. Il semble donc que *B. chlororaphis* soit assez rare en Lorraine puisque MACÉ ne l'a rencontré que quelques fois et, personnellement, je ne l'ai isolé qu'une ou deux fois. En est-il de même en d'autres régions? Dans le but de résoudre cette question, je me suis adressé aux savants bactériologistes (1) dont les Laboratoires sont connus pour l'analyse des eaux.

M. le professeur COURMONT (Lyon) a bien voulu faire effectuer durant plusieurs mois des analyses d'eaux avec recherche spéciale de *B. chlororaphis*, il n'est pas arrivé à le déceler.

M. MIQUEL (Paris) ne l'a jamais rencontré dans les eaux, mais il me fait remarquer qu'il n'a jamais orienté aucune recherche dans le but de le différencier des bacilles qui peuvent lui ressembler.

M. le professeur BODIN (Rennes) me dit n'avoir jamais eu l'occasion de l'observer étant donné l'esprit dans lequel sont effectuées les analyses d'eaux à son laboratoire. M. le professeur LAGRIFFOUL (Institut Bouisson-Bertrand, Montpellier); M. le professeur FICKER (Institut d'hygiène Berlin); HARRISON (Macdonald College, Canada) ne l'ont jamais rencontré.

La Smithsonian Institution (Washington) a bien voulu faire une enquête auprès des chimistes bactériologistes du Département de l'Agriculture, du Bureau de la Santé publique et du Service de l'Hôpital maritime. Il résulte de cette enquête que, nulle part, le Bacille n'a été signalé sur le territoire des États-Unis. En résumé,

(1) J'adresse à tous ces Savants l'hommage de ma respectueuse gratitude.

le Bacille n'a jamais été observé en Amérique et il ne l'a été que très rarement en France.

L'organisme est-il réellement aussi peu fréquent dans les eaux ? Je ne le crois pas ; il a dû bien souvent passer inaperçu lorsque la fluorescence faisait défaut et que la formation des cristaux, seul diagnostic de *B. chlororaphis*, se faisait trop tardivement.

Avant de conclure sur son degré de fréquence, il serait donc désirable que des recherches spécifiques et statistiques soient effectuées ; dans ce but, je conseillerai d'ensemencer directement l'eau à examiner sur gélose asparagine alcaline (milieu dont la formule sera donnée plus loin) ; de la sorte, on éliminera nombre d'espèces bactériennes et le Bacille pourra plus sûrement donner des cristaux. On arrivera à un meilleur résultat encore en faisant porter l'examen sur 100 centimètres cubes d'eau qui seront ensemencés dans 100 centimètres cubes de bouillon synthétique type (dont on aura doublé les doses des éléments constitutants) légèrement acidulés par l'acide phosphorique et en portant le tout à l'étuve à 25-30° C. Si au bout de dix jours on n'a pas obtenu de cristaux, onensemencera la culture sur gélose asparagine.

MORPHOLOGIE

FORMES — SUCCESSION DES FORMES

B. chlororaphis se présente sous des aspects variés, mais toutes les cultures que j'ai examinées étant issues d'une même colonie primitive, les variations de forme observées n'ont pu être déterminées que par l'âge du bacille, la nature et la réaction de l'aliment mis à sa disposition, la température de culture, et la vie plus ou moins aérienne de l'organisme, suivant qu'il se trouvait à la surface ou à l'intérieur de la culture.

Je n'ai pas la prétention de donner un tableau complet de la vie de l'espèce puisque les formes que j'ai observées dérivent d'une même colonie.

D'autres changements de milieu peuvent déterminer des variations plus marquées. C'est ainsi que la race découverte par GUIGNARD et SAUVAGEAU diffère de celle que j'ai cultivée par la tendance à une sporulation facile et prompte. Je n'ai pu me procurer cette race remarquable qui a été perdue presque aussitôt qu'isolée.

Je me suis efforcé d'être aussi précis que possible dans la description de la race que le hasard a mise entre mes mains.

Gélose peptonée glucosée. — Cultivé sur gélose peptonée glucosée, *B. chlororaphis*, dans des cultures âgées de dix-huit à vingt-quatre heures, se présente avec les caractères suivants : examiné dans une goutte de bouillon ou de solution physiologique, avec ou sans coloration vitale ou après fixation et coloration par une solution aqueuse au violet de gentiane, il a une forme allongée, droite ou légèrement incurvée, à extrémités arrondies, mesurant de $(3^{\mu} - 8^{\mu}) \times (0^{\mu},7 - 0^{\mu},8)$ (Voir pl. fig. 2, a). Le cytoplasme ne présente pas de différenciation.

A côté de cette forme dominante, on peut remarquer des cellules plus courtes et richement vacuolées.

Dans les cultures âgées de quarante-huit heures, les éléments allongés deviennent rares et on observe surtout des formes de 2 à 3^{μ} sur $0^{\mu},7$ à $0^{\mu},8$ (Voir pl. fig. 2, b).

Le contenu cellulaire ne paraît pas différencié, tout au plus peut-on observer parfois une coloration plus faible de la partie centrale.

Enfin au bout de trois à quatre jours, l'examen des cultures montre que les dimensions des éléments bactériens ont encore diminué, ils ne mesurent plus que $(1^{\mu},7 - 2^{\mu},4) \times (0^{\mu},7 - 0^{\mu},8)$ et ils présentent une grande vacuole centrale.

On trouve aussi des corps microbiens de même taille que les précédents, sans vacuole, présentant seulement une coloration intense aux deux pôles et une teinte extrêmement faible dans la partie médiane. Celle-ci sera vraisemblablement occupée plus tard par la vacuole.

Au fur et à mesure que la culture vieillit, les éléments à vacuole

centrale deviennent plus nombreux, formant souvent des plages, ils diminuent encore de taille ne mesurant plus que $(1^{\mu},2 - 0^{\mu},8) \times (0^{\mu},4 - 0^{\mu},5)$.

Indépendamment des formes étudiées ci-dessus, on rencontre dans des cultures de tout âge, cultures de vingt-quatre heures comme cultures de huit à dix jours, des formes rondes, à contenu cellulaire non différencié mesurant $0^{\mu},7$ à $0^{\mu},8$ de diamètre (Voir pl. fig. 2, d).

La succession des formes de *B. chlororaphis* cultivé sur gélose peptonée glucosée n'est pas toujours aussi régulière que je viens de l'indiquer. Des cultures de quarante-huit heures peuvent présenter uniquement des cellules de $1^{\mu},7$ à $2^{\mu},5$ de long avec une vacuole centrale.

Si l'on opère avec des géloses ayant perdu leur eau de condensation, des cultures de vingt-quatre heures ne présentent pas la forme allongée, mais des éléments plus petits, à vacuoles nombreuses, et des cellules courtes à vacuole centrale.

Bouillon peptoné glucosé. Solution de peptone. — Cultivée sur bouillon peptoné glucosé ou sur solution de peptone, la Bactérie mesure $1^{\mu},5$ sur $0^{\mu},8$, ses extrémités sont arrondies ou effilées et elle a parfois la forme de navette ou de tonnelet. Tantôt le cytoplasme est homogène, tantôt il présente de nombreuses petites vacuoles, plus rarement une grande vacuole centrale unique. Sans qu'il soit possible d'en fixer l'ordre d'apparition, on voit des formes vacuolées plus courtes de $(0^{\mu},8 - 0^{\mu},7 \times (0^{\mu},6 - 0^{\mu},7)$ ou sphériques ayant environ $0^{\mu},8$ de diamètre.

Sur bouillon peptoné, le Bacille se rapproche plus du type décrit par GUIGNARD et SAUVAGEAU; toutefois, il en diffère en ce qu'il ne présente pas de renflements aux extrémités.

Milieu synthétique type. — Ce milieu est le plus favorable à la culture du Bacille et les raisons qui le font considérer comme tel seront indiquées plus loin. Le Bacille y atteint des dimensions plus grandes que sur le bouillon peptoné et la diversité des formes est encore plus accusée.

Cultures de quinze à vingt-quatre heures. — Le Micro-organisme se présente généralement encore comme un bacille allongé, à extrémités le plus souvent effilées, plus rarement arrondies.

D'autres fois, il affecte la forme de navette. Les dimensions, variables avec la culture, oscillent entre $(3^{\mu} - 7^{\mu}) \times (0^{\mu},8 - 1^{\mu})$.

A côté, on trouve des bacilles plus courts ($1^{\mu},5$ à 2^{μ}) présentant parfois de petites vacuoles.

Dans certaines cultures, on observe des cellules rondes ayant $0^{\mu},9$ à 1^{μ} de diamètre en moyenne, mais pouvant atteindre $2^{\mu},2$.

Cultures de trente-six à cinquante heures. — La forme allongée ne domine plus, elle est partiellement remplacée par des cellules ovoïdes mesurant de 2^{μ} à 3^{μ} de longueur. Le contenu cellulaire peut ne pas être différencié, mais souvent les deux extrémités se colorent plus fortement que le milieu et ce dernier présente quelquefois de nombreuses petites vacuoles ou une grande vacuole centrale.

Cultures de trois à quatre jours. — On ne trouve presque plus que des formes courtes ($1^{\mu} - 1^{\mu},5$) $\times$ ($0^{\mu},5 - 0^{\mu},8$) avec vacuole.

A mesure que la culture vieillit, les dimensions du Bacille se réduisent et les formes rondes deviennent de plus en plus nombreuses, ce qui fait que des cultures de deux mois (parfois même de dix jours) donnent l'impression d'une culture de *Micrococcus* de $0^{\mu},7$ à $0^{\mu},9$ présentant quelques bacilles comme impurifiés. Certaines cellules présentent des granulations cytoplasmiques de forme et de dimensions variables. Certaines de ces granulations se colorent en rose ou en rougeâtre par les bleus de méthylène et de toluidine.

L'époque d'apparition des différentes formes est sujette à variations. Ainsi, des cultures de quarante-huit heures peuvent ne présenter que des formes très courtes, vacuolées, et des cellules rondes, tandis que des ensemencements de vingt-trois jours montreront un mélange de cellules vacuolées avec d'autres à contenu non différencié. Mais si on ne peut fixer l'instant du

passage d'une forme à une autre, l'ordre dans lequel les transformations se font est assez régulier et la présence des éléments vacuolés dans les cultures anciennes est un fait général sans aucune exception.

La comparaison des résultats obtenus dans des milieux normaux montre que l'on peut distinguer des formes jeunes caractérisées par une plus grande longueur de la cellule et un cytoplasme non différencié, et des formes âgées, vivant dans des milieux appauvris, que l'on reconnaît à leurs dimensions plus réduites et à la vacuolisation du cytoplasme.

Je vais passer à l'étude des cultures sur des milieux que je considère comme anormaux. Dans ces milieux, l'âge de la culture n'est plus la seule cause à considérer dans l'évolution des formes de la Bactérie. Celle-ci, dès le début, en présence d'un milieu peu favorable, présente des aspects nouveaux.

Milieu synthétique type additionné d'ammoniaque. — Le Bacille est très sensible à l'ammoniaque; cultivé dans un bouillon renfermant par exemple 0g,034 de N H_3 %, il prend la forme d'un bâtonnet allongé à extrémités généralement arrondies et de dimensions variables. Il peut atteindre jusqu'à 15 μ de long sur 0 μ ,8 à 0 μ ,9 de large (Voir pl. fig. 6). Souvent, plusieurs éléments restent unis et forment alors des filaments assez longs.

Le contenu cellulaire ne paraît pas sensiblement différencié, sauf en quelques points où il existe de petites vacuoles pariétales.

Milieu synthétique type additionné d'acide sulfurique. — Dans le milieu additionné d'acide sulfurique (0g,098 de $\text{H}_2 \text{SO}_4$ %) les cellules de dimensions normales sont rares; on voit apparaître une forme courte, carrée, rectangulaire, ou trapézoïdale, mesurant de (0 μ ,7 — 1 μ ,5) $\times$ (0 μ ,7 — 1 μ ,2) (Voir pl. fig. 5).

Les éléments sont isolés ou disposés de façon à simuler des diplobacilles, rarement ils sont en chaînettes.

Milieu synthétique (acide aspartique plus NH_3). — Cultivée sur milieu synthétique à base d'acide aspartique, plus ammoniac, la Bactérie devient filamenteuse; chaque filament, composé de plusieurs individus dont chacun atteint parfois une longueur de 18μ , peut mesurer et dépasser 60μ de long sur $0\mu,5$ à 1μ de large.

Les éléments, qui forment de longs filaments, présentent fréquemment des renflements en forme de massue, leur cytoplasme est vacuolaire. De plus, il semble, mais c'est là un point que je ne puis préciser, qu'une gaine existe tout autour des filaments (Voir pl. fig. 7).

On rencontre çà et là des éléments isolés piriformes à grande vacuole, occupant le tiers ou la moitié du corps bactérien.

Milieu synthétique (asparagine avec succinate et propionate). — Dans ce milieu, le Microorganisme se montre sous des aspects variés. Le plus souvent il présente des formes plus ou moins allongées à extrémités arrondies ou renflées en massue ou en haltère dont les dimensions sont de 5 à 6μ de long sur $1\mu,2$ à $1\mu,7$ de large (Voir pl. fig. 8). Tous ces éléments sont richement vacuolés. Dans certaines cellules, les vacuoles viennent au contact les unes des autres, se fusionnant plus ou moins complètement pour donner une grande vacuole. Cette vacuole peut atteindre des dimensions telles que la cellule se présente comme réduite uniquement à son enveloppe.

La caféine, l'acide phénique en bouillon peptoné, le bichromate de potasse et l'acide borique en milieu synthétique type ne déterminent pas de variations morphologiques intéressantes.

Milieu synthétique type (Culture à 40°C). — Nous venons d'étudier les variations morphologiques du Bacille sous l'influence de divers agents chimiques, nous allons examiner maintenant les modifications de forme que l'on peut imposer à la Bactérie à l'aide d'un agent physique, la chaleur.

Les cellules sont plus allongées qu'à $25-30^\circ \text{C}$. Le cytoplasme

devient vacuolaire et renferme des granulations, parmi celles-ci certaines sont métachromatiques (Voir pl. fig. 9).

Il est à remarquer que toutes les semences ne sont pas également sensibles à l'action de la chaleur.

GROUPEMENT ET ARRANGEMENT

Dans les cultures faites sur les divers milieux que nous venons d'examiner, les bacilles se présentent suivant des groupements variables. C'est ainsi que dans le cas, soit de cellules allongées, soit de cellules courtes, celles-ci se groupent souvent en diplobacilles, ou en chaînettes de trois à six éléments. Dans d'autres cas, les éléments bactériens sont groupés en amas irréguliers. Enfin, on observe très rarement des essaims formés de bacilles courts, de taille et d'aspect très réguliers, également distants les uns des autres.

Lorsqu'il existe des formes rondes, celles-ci se montrent soit isolées, soit sous l'aspect de diplocoques. On les trouve même aussi fréquemment réunies en îlots et pressées les unes contre les autres.

COLORATION NATURELLE

Examiné dans une goutte de bouillon ou de liquide physiologique, le Bacille est incolore; cependant DANGEARD (1909), dans ses belles études sur les Bactériacées vertes, range *B. chlororaphis* parmi celles-ci. Dans un intéressant travail, cet auteur rappelle qu'il a décrit, en 1890, un organisme filamenteux sous le nom d'*Eubacillus multispurus*; il montre ensuite comment on peut réunir, dans ce groupe des *Eubacillus*, cinq autres espèces décrites par L. KLEIN et il ajoute: nous connaissons encore deux Bactéries vertes: l'une est le *Bacillus chlorinus* ENGELMANN (1882); la seconde est le *Bacillus chlororaphis* GUIGNARD et SAUVAGEAU.

Nous n'avons pas à nous occuper ici de *Bacillus chlorinus*,

mais, en ce qui concerne *B. chlororaphis*, je rappellerai que GUIGNARD et SAUVAGEAU l'ont considéré comme « *complètement incolore par lui-même* ». Les observations de ces savants ont été confirmées depuis par les quelques auteurs qui ont eu l'occasion d'observer *B. chlororaphis* et le type que j'ai étudié m'a conduit aux mêmes conclusions.

Que dans certaines conditions de cultures anormales (présence de NH_3) les cellules paraissent légèrement colorées en bleu pâle, le fait est possible, mais jamais on n'observe, dans quelque culture que ce soit, une coloration verte des bacilles, si faible soit-elle.

Pour donner plus de garantie à mon assertion, j'ai montré diverses préparations non fixées et non colorées de *B. chlororaphis* à plusieurs micrographes éminents et aucun d'eux n'a pu découvrir de cellules bactériennes teintées en vert.

J'ajouterai que, pour éviter toute équivoque, je me suis rigoureusement astreint à ne pas employer le mot *pigment* (1) dans l'étude de la xanthoraphine, de la chlororaphine et de l'oxychlororaphine. On ne saurait d'ailleurs rapprocher la chlororaphine des chlorophylles; ces substances n'ont de commun qu'une coloration voisine: *B. chlororaphis* ne peut donc être rattaché au groupe des microorganismes verts décrits par ENGELMANN (1882) (*Bacterium chlorinum*), par VAN TIEGHEM (1880) (*Bacterium viride*, *Bacillus virens*), par DANGEARD (1891 et 1909) (*Eubacillus multispurus*, *Bacillus virescens*).

Au contraire, par ses caractères morphologiques et de culture, ses propriétés bio-chimiques et son pouvoir pathogène, il doit être considéré comme un bacille fluorescent. Enfin, par sa fonction chromogène, il peut être rapproché de *B. pyocyaneus*: c'est ce que je démontrerai dans un prochain travail.

(1) A propos du choix des qualificatifs applicables aux substances colorées observées dans les cultures microbiennes, je ferai remarquer qu'en bactériologie on abuse du terme de matière colorante en l'appliquant fréquemment aussi bien aux chromogènes qu'aux véritables colorants, c'est-à-dire aux corps possédant, outre leur couleur propre, la propriété de teindre (Voir O. N. WITT, *Berichte d. deutsch. Chem. Geselsch.* 1876).

COLORATION PAR LES RÉACTIFS

Le Bacille se colore aisément par toutes les couleurs basiques d'aniline. Les préparations les plus fines sont données par le violet de gentiane en solution aqueuse.

Par la méthode de GRAM modifiée et par celle de CLAUDIUS, les bacilles, sur les divers milieux solides ou liquides, ne conservent pas la coloration; cependant, dans les préparations faites au début de mes recherches, j'ai trouvé, à côté d'individus nettement décolorés, des cellules qui gardaient parfaitement le Gram. Or, actuellement, comme nous venons de le voir, même en prolongeant le Gram, toutes les cellules sont décolorées; il semble donc que la Bactérie a subi une modification dans ses propriétés vis-à-vis de certains colorants.

STRUCTURE

Nous avons vu précédemment que, dans les cultures jeunes, les bacilles ont un cytoplasme homogène; puis, à mesure que la culture vieillit, on voit apparaître des vacuoles qui, d'abord isolées, se fusionnent dans certains cas et finissent par occuper la presque totalité de la cellule.

En même temps qu'apparaissent les vacuoles, le cytoplasme se condense aux pôles. Ces amas polaires se présentent sous différents aspects : tantôt en forme de croissants, plus rarement en forme de sphères; on trouve tous les intermédiaires entre ces deux formes. Certaines cellules présentent des granulations dont la taille, le nombre et la position sont variables. Parmi celles-ci, certaines, logées dans de petites vacuoles, présentent la propriété de se colorer en rouge plus ou moins foncé par le bleu de méthylène, le bleu de toluidine ou le bleu polychrome. Ces granulations paraissent donc être identiques aux *corpuscules métachromatiques de Babès (1895)*, *corpuscules de Ernst (1888-1889-1902)*, aux *grains rouges de Bütschli*, aux *grains de volutine*

de Meyer (1904). Ces corpuscules métachromatiques se rencontrent dans des cultures âgées, comme dans des cultures jeunes faites à la température de 40°, dans des cultures sur acide aspartique plus NH_3 et dans les milieux très pauvres en acide phosphorique. J'ignore si les grains métachromatiques jouent ici le rôle de matières de réserves ainsi que l'ont constaté GUILLERMOND (1902) chez divers Champignons et GRIMME (1902) chez certaines Bactéries. On voit donc que, contrairement à l'hypothèse de H. MARX et WOITHE (1900 et 1901) qui veulent que les corpuscules métachromatiques n'apparaissent que dans des cultures au maximum de vitalité, ces corpuscules s'observent tout aussi bien dans des cultures maintenues dans des conditions peu favorables au développement des bacilles. Par conséquent, la présence des grains métachromatiques ne saurait servir de critérium de vitalité, pas plus, d'ailleurs, qu'elle ne prouve la virulence de la Bactérie. KROMPECHER (1901), ASCOLI (1901), GAUSS (1902), VLAD. RUZKA (1903), etc., sont arrivés aux mêmes conclusions.

MOTILITÉ

Les cultures sur milieux liquides ou solides montrent des éléments extrêmement mobiles. En goutte pendante, le bacille monte et descend avec agilité dans la couche de liquide qui compose la préparation microscopique, il pirouette sur lui-même de façon à se présenter soit par l'une de ses extrémités, soit obliquement, soit dans le sens de la longueur.

Examinés entre lame et lamelle, certains bacilles sont animés d'un mouvement de progression suivant une ligne droite ou sinueuse. Des cellules se déplaçant moins rapidement permettent de constater un mouvement d'oscillation autour de l'axe de translation. Quelques-unes effectuent un mouvement de rotation rapide autour de leur petit axe, puis, brusquement, s'enfuient en ligne droite.

D'autres éléments ne présentent que de faibles oscillations

latérales. Tant que la réaction du milieu permet la végétation normale, l'acidité ou l'alcalinité influencent très peu la motilité des cellules bactériennes. Par contre, la motilité est influencée par la température. Des cultures faites à 40° C. ne présentent plus d'éléments mobiles. A 25-30° C., la motilité persiste assez longtemps, mais cependant beaucoup moins qu'à la température du laboratoire, où des cultures de un à deux mois offrent encore des cellules se déplaçant avec rapidité.

Une trace d'antiseptique supprime les mouvements. L'atropine, la codéine les activent.

J'ai pu faire quelques moyennes de mensuration à la température de 17° avec des cultures de deux, trois, cinq jours en milieu neutre. Différents éléments bactériens ont parcouru en une seconde des distances variant entre 4 et 22^μ.

FLAGELLA

Pour mettre les flagella en évidence, j'emploie le mode opératoire suivant :

Des cultures de douze à vingt-quatre heures, faites sur gélose à eau de condensation, sont d'abord fixées par la chaleur (deux minutes à 110°). J'applique ensuite la méthode de VAN ERMENGEM avec quelques légères modifications, je prolonge le séjour dans le bain fixateur (acide osmique) durant vingt-quatre heures, puis, je lave les préparations à l'eau et à l'alcool absolu jusqu'à ce que les gouttelettes deviennent incolores, enfin, je continue suivant la technique de VAN ERMENGEM mais en opérant vers 37-39° C.

La méthode est fidèle et donne de belles images sur lesquelles on constate l'existence de flagella polaires, tantôt à une seule extrémité, tantôt aux deux. Leur nombre peut varier de un à six (Voir pl. fig. 3).

Les formes rondes, isolées ou en diplococcus, peuvent présenter, elles aussi, de un à trois flagella.

Les fouets persistent pendant un certain temps dans les

cultures et sont peu fragiles, l'examen des préparations ne montre que de rares flagella isolés du corps bactérien.

La méthode à l'orcéine de BOWHILL (1898) est incertaine, mais les quelques préparations que l'on peut obtenir sont belles. Celle de BENIGNETTI et GINO (1906) donne quelques bactéries très bien colorées; malheureusement, peu de cellules conservent leurs fouets.

CAPSULE

Le chlorure de lithium (gélose lithinée à 2%) détermine un gonflement du pourtour de la cellule aboutissant à la formation d'une auréole hyaline non colorable (Voir pl. fig. 4). La présence de cette sorte de capsule n'exclut pas celle des flagella et l'examen des bacilles auréolés montre que les flagella s'insèrent sur le corps bacillaire et non aux limites de l'auréole. Le pouvoir de reproduction de ces éléments microbiens reste sensiblement égal à celui des cellules normales. D'après GAMALEIA (1894), l'auréole serait destinée à protéger la cellule contre l'absorption du chlorure de lithium. A ce sujet, je ferai remarquer que j'ai constaté aussi l'ébauche de cette auréole dans des cellules sur gélose non lithinée et partiellement déshydratée et dans certains milieux chimiques très riches en sels minéraux.

FORMES DE RÉSISTANCE — SPORES

GUIGNARD et SAUVAGEAU ont signalé la présence de spores dans les cultures de cinq à six jours. De plus, JIROU (1901) a observé des organes de résistance dans les cultures de quatorze bacilles fluorescents parmi lesquels il a rangé *B. chlororaphis*.

Pour cet auteur « on rencontre à l'intérieur du bacille, d'une façon constante sur milieux chimiquement définis, rarement sur milieux albuminoïdes, des corps arrondis contenus dans la membrane rigide, dont un espace clair les sépare...

« Dans les mêmes cultures et avec une abondance proportionnelle on rencontre, hors des éléments, des corps ronds, de diamètre égal, constitués par une enveloppe très réfringente, limitant un espace central très clair. Les corpuscules intra-bacillaires sont plus fortement colorés que le reste du bacille; les corpuscules extra-bacillaires sont plus facilement colorés, mais résistent mieux au Gram et au Claudius. Faut-il concevoir les corps intra-bacillaires comme des spores en voie de formation, « des corps sporogènes » (ERNST) enkystés, et les corps extra-bacillaires comme de vraies spores, des spores définitives? Cela semble vrai quoique BÜSSE l'ait nié. »

L'hypothèse émise par JIROU, les observations de GUIGNARD et SAUVAGEAU m'ont conduit à l'étude des formes de résistance dans les cultures de *B. chlororaphis*.

Mais, avant d'exposer le résultat de mes recherches, je rappellerai les principales propriétés des spores bactériennes.

Les spores des bactéries, examinées en préparations non colorées, apparaissent sous la forme de corpuscules très réfringents. D'autre part, les spores ne sont pas justiciables des procédés de coloration habituels et se présentent sous l'aspect de taches claires dans les bacilles colorés. Par contre, elles ont, comme les bacilles acido-résistants, la propriété de rester colorées en rouge par la méthode de ZIEHL. De plus, et ce sont là leurs caractères essentiels, les spores sont très résistantes aux agents physiques, chimiques et elles germent lorsqu'elles sont placées dans des conditions favorables.

J'ai donc cherché dans les cultures de *B. chlororaphis* des éléments bactériens présentant les propriétés énumérées ci-dessus. Dans les préparations non colorées, je n'ai jamais observé de bacilles offrant des granulations très réfringentes, et les microcoques n'étaient jamais pourvus d'un éclat particulier. En colorant une préparation par les procédés ordinaires, tous les éléments cellulaires d'une culture se colorent également. Lorsqu'il existe des grains assez brillants, ils sont métachromatiques ou bien se colorent beaucoup plus facilement que le reste du cytoplasme avec une solution aqueuse de violet de gentiane. La méthode de ZIEHL n'a jamais montré d'éléments acido-résistants. Mais, comme il pourrait se faire que l'existence de spores échappe à l'examen microscopique, j'ai cherché à vérifier s'il

n'existait pas de phénomènes de germination. A cet effet, j'ai eu recours aux deux procédés suivants :

1° Des formes, courtes, rondes, provenant de cultures d'âges divers, étaient cultivées en cellules. La chambre humide était maintenue à la température eugénésique, grâce à l'emploi de la chambre chaude de VIGNAL. Je suivais au microscope le développement des formesensemencées.

2° Des éléments bactériens semblables à ceux utilisés ci-dessus, étaientensemencés dans des tubes de bouillon placés à l'étuve. Toutes les vingt minutes, je prélevais une goutte de cette culture avec laquelle je faisais une préparation.

L'emploi de ces deux moyens combinés ne m'a permis d'observer aucun phénomène de germination.

Enfin, comme vérification complémentaire, des cultures de six jours à trois mois ont été soumises pendant dix minutes à des températures de 63°, 64°, 65° C. et aucun élément chauffé n'a survécu. Toutes les cultures ont été stérilisées.

D'ailleurs, les formes rondes peuvent offrir des images de division, elles ne paraissent pas non plus dériver des corps arrondis intra-bacillaires de JIROU. On les trouve, en effet, très souvent en abondance dans les cultures, alors qu'à aucun moment on n'a constaté la présence de corps intra-bacillaires. Enfin ceux-ci ont souvent un diamètre différent de celui des formes rondes. Il résulte de cet ensemble d'observations que l'on ne peut attribuer aux formes bacillaires rondes que j'ai décrites la valeur de spores comparables aux organes de résistance des *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. mesentericus vulgatus*, *B. mesentericus ruber*, etc... *Le type de B. chloraraphis que j'étudie est donc une race asporogène.*

RÉSUMÉ

En résumé, les variations dans la composition chimique de l'aliment déterminent de nombreux changements de formes du Bacille. Mais, quelle que soit la modification morphologique

apportée, la nature spécifique de la Bactérie n'est pas modifiée, car n'importe quelle forme replacée dans les conditions normales redonne toujours plus ou moins vite le Bacille type. On voit donc que, dans le cas d'un diagnostic, la forme n'est qu'un des éléments accessoires de la diagnose puisqu'elle varie avec le milieu.

CARACTÈRES DE CULTURE

L'étude des caractères morphologiques du *B. chlororaphis* conduit à cette conclusion que, à eux seuls, ils ne définissent pas suffisamment l'espèce; il faut donc compléter la diagnose par l'étude des phénomènes physiologiques. Parmi ceux-ci, il en est un qui a attiré l'attention des premiers observateurs : c'est la production des cristaux verts, caractère qui a fait donner au Bacille le nom spécifique de *chlororaphis* imposé par GUIGNARD et SAUVAGEAU. J'étudierai tout spécialement cette production de matière chromogène à laquelle j'ai donné le nom de : *chlororaphine* et, à cette étude, je rattacherai les autres effets que la vie de la Bactérie détermine sur le milieu qui la nourrit : voile, fluorescence, liquéfaction, réaction, odeur du milieu, production d'indol, réduction des nitrates, etc. Mais, auparavant, il me paraît utile d'étudier la réaction du Bacille à différents agents (oxygène, température).

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES CULTURES

Vitalité dans les cultures. — La végétation dure beaucoup moins longtemps en bouillons peptonés qu'en milieu synthétique. Sous l'influence des peptones, la Bactérie perd rapidement son pouvoir chromogène; mais on remédie à cet inconvénient en faisant de fréquents passages sur gélose ou gélatine.

C'est sur pomme de terre que la Bactérie conserve le plus longtemps sa vitalité. De vieilles cultures de neuf, dix et dix-huit mois, conservées à l'obscurité et à la température de la

chambre ont été ensemencées en milieu synthétique; toutes ont donné une végétation normale avec cristaux.

Aérobiose. — *Bacillus chlororaphis* est très avide d'oxygène. Il forme des voiles, des pellicules à la surface des milieux de culture, c'est-à-dire là où l'air a le plus facilement accès. Si le gaz ne pénètre que difficilement dans le vase où se fait la culture, celle-ci devient languissante et s'arrête dès que l'oxygène libre a été consommé. Vient-on à aérer le milieu, la végétation reprend aussitôt. La Bactérie peut même se développer dans une atmosphère d'oxygène pur, mais elle ne peut vivre en l'absence rigoureuse de ce gaz. L'oxygène, l'hydrogène, l'azote, l'acide carbonique ne paraissent pas avoir d'action sur les caractères morphologiques du Bacille, tandis qu'ils ont une grande influence sur ses caractères physiologiques et sur sa fonction chromogène en particulier, ainsi que nous le verrons plus loin.

Température (*Essais effectués en milieux peptonés*). — Le développement, la fluorescence et la production de cristaux se font facilement vers 10-12° C. L'optimum pour la production du chromogène fluorescent est de 22-25° C. et la température la plus favorable pour le développement de la Bactérie est voisine de 25° C. Au-dessus de 30° C., la production des cristaux et la fluorescence diminuent; la végétation se montre plus intense pendant les premiers jours, mais la culture s'épuise plus rapidement et le développement s'arrête beaucoup plus tôt qu'à la température de 25° C. Le poids total de corps bactérien produit de 25 à 32° C. est sensiblement le même; l'élévation de la température n'a donc fait qu'activer le développement du Bacille et son action est analogue à celle qu'elle exerce sur certaines réactions chimiques qui, pour s'effectuer à la température ordinaire, demandent un temps très long, tandis qu'à une température élevée elles se produisent très rapidement. Cependant, certaines races donnent une culture normale avec chlororaphine à 35° C., mais ce sont là des exceptions. A 36-37° C., il n'y a plus production de cristaux. Le développement intense ne dure que quelques

jours; la fluorescence faible, quelquefois nulle, varie avec les cultures et elle persiste de préférence en milieux peptonés (peptones Defresne).

A 40° C., la culture est faible, le voile nul ou réduit à une mince pellicule. A 42° C., le Bacille ne trouble pas le milieu. Le Microbe est tué par un chauffage de dix minutes à 63° C. A 60° C. température critique de MIQUEL (1902) ou zone mortelle de DUCLAUX (1898), la moitié seulement des divers échantillons d'une même culture sont tués.

La Bactérie paraît assez bien résister au froid; de très jeunes cultures, soumises à des alternatives de gels et de dégels etensemencées ensuite, poussent abondamment et donnent des cristaux. La température minima de croissance paraît être assez basse, mais je n'ai pu la déterminer rigoureusement.

De ce qui précède il résulte que *B. chlororaphis* est un organisme nettement *aérobie*. La température la plus favorable est voisine de 25° C., il résiste assez bien au froid mais est tué à 63° C. (dix minutes).

CULTURES SUR LES MILIEUX USUELS

J'ai cultivé *B. chlororaphis* sur trois catégories de milieux :

1° Les milieux usuels destinés à mettre en évidence certaines propriétés biologiques du Microbe;

2° Des milieux spéciaux permettant d'étudier l'action chimique de la Bactérie sur un élément déterminé;

3° Des milieux spécifiques (milieux synthétiques) destinés à exalter les fonctions fluorescigène et chromogène.

Gélatine-peptone-glucose-bouillon (gélatine : 10 %; peptone 1 %; glucose : 1 %). — La réaction est neutre ou alcaline (4 décigrammes de soude par litre).

La température est celle de la chambre.

A) *En plaques*. — Cultivé sur plaque de gélatine, *B. chlororaphis* se développe assez rapidement et, au bout de trente-six

heures, on voit apparaître des colonies grisâtres par transparence, à peine visibles à l'œil nu. Après quarante-huit heures, ces colonies sont rondes, visqueuses, grisâtres (blanc-jaunâtre à 50 diamètres). Elles peuvent être transparentes, brillantes, et leurs bords sont fortement lobés et à incisions profondes. On peut observer, vers le troisième jour, de petites cupules incolores avec dépôt blanc, jaunâtre au centre. Leur diamètre est de 1 à 2 millimètres, mais il va en augmentant et le cinquième jour il atteint 1 à 2 centimètres. A ce moment, les cupules sont circulaires, à bords finement dentelés, transparentes, et parcourues par des lignes ramifiées allant du centre à la périphérie. Avec le temps, les colonies s'accroissent rapidement, deviennent irrégulières et donnent un liquide quelquefois jaunâtre, mais plus souvent incolore tenant en suspension des flocons de couleur jaunâtre ou jaune citron.

Une seule colonie peut liquéfier la gélatine d'une boîte de Pétri en dix à douze jours. Le produit de liquéfaction est alcalin et doué d'une odeur caractéristique. La culture n'est pas, en général, fluorescente; cependant, la première que j'ai obtenue en partant de l'eau était entourée d'une couronne fluorescente. Le fond de la boîte est quelquefois tapissé d'un enduit vert ou vert noir. Les cristaux apparaissent à une époque variable. Dans quelques cas, j'ai pu les observer le quatrième jour, d'autres fois, le dixième ou le quinzième jour seulement. Vertes au début, les formes cristallines jaunissent à mesure que la culture vieillit.

B) *En piqûre*. — Ensemencé par piqûre dans un cylindre de gélatine, *B. chlororaphis* détermine, vers la quinzième heure, la formation, à la surface du milieu, d'une petite cupule dont la partie supérieure est occupée par de l'air et le fond tapissé par un dépôt blanchâtre. Puis, la cupule s'accroît beaucoup plus rapidement dans le sens diamétral qu'en profondeur, et au bout de quarante-huit heures, la liquéfaction a atteint les parois du tube. La gélatine se liquéfie sur une hauteur de 6 à 8 millimètres en donnant un liquide trouble présentant un voile très mince et un dépôt blanchâtre au fond.

La liquéfaction continue par tranches transversales, le voile

se développe de plus en plus et le trouble se localise dans la partie supérieure du liquide.

Vers le cinquième jour, le liquide se teint en jaune et la partie trouble est réduite à quelques millimètres de hauteur; au fond, sur le dépôt blanchâtre ou jaunâtre, apparaissent les cristaux verts.

La liquéfaction atteint rapidement les trois quarts du tube, puis elle se ralentit et au bout d'un temps variable, la gélatine est complètement transformée en un liquide glaireux, alcalin et odorant.

La culture est rarement fluorescente et, à son aspect, il serait impossible de reconnaître sûrement le Bacille si les cristaux faisaient défaut.

Gélose-peptone-glucose-bouillon (Gélose 2 %; peptone 1 %; glucose 1 %).

En plaques. — *Bacillus chlororaphis* cultivé sur plaque de gélose offre des colonies d'aspect divers que l'on peut ramener à quatre types :

Premier type : On obtient le plus souvent des colonies rondes, plates ou légèrement bombées, visqueuses, aux bords ondulés, de coloration blanc grisâtre avec cristaux au centre.

Deuxième type : Plus rarement, on trouve des colonies à peu près semblables aux précédentes, mais présentant en outre une auréole verte, fluorescente. Les cristaux sont moins nombreux que dans les premières.

Troisième type : On remarque assez souvent des colonies à centre jaune d'or ou jaune orangé et dont la partie externe est transparente. Les cristaux sont peu abondants.

Quatrième type : Enfin, on observe des colonies rondes, bleu-tées, brillantes, transparentes, aux bords très découpés et à surface plissée. Au centre et un peu excentriquement, on trouve la colonie primitive avec de magnifiques cristaux verts. Cette colonie n'adhère que très peu à la gélose et s'enlève très aisément d'une seule pièce. Il semble que ces colonies soient beaucoup plus abondantes sur les vieilles géloses ou si, utilisant des géloses frai-

ches, on n'évite pas l'évaporation durant le séjour des cultures à l'étuve.

L'examen des différents types de cultures montre des organismes ayant sensiblement mêmes caractères morphologiques, les modifications de formes sont si peu caractéristiques que, sur une préparation, il est impossible de reconnaître sur quelle colonie le Bacille a été prélevé.

Quant à la fonction chromogène, l'ensemencement en milieu synthétique type ne montre pas de grandes différences, le premier et le quatrième type donnent en général une bien plus belle production de cristaux, le troisième donne des cultures plus jaunes et avec le deuxième, la fluorescence est plus marquée. Je n'ai pas réussi à fixer ces différents types.

Enfin, notons seulement, pour l'instant, que des colonies de tous types peuvent très fréquemment ne pas présenter de cristaux, nous aurons l'occasion de revenir sur ce fait.

Gélose asparagine. — La gélose peptonée glucosée que nous venons d'étudier convient assez mal à la production de la chlororaphine. J'ai cherché à réaliser une gélose permettant une formation plus abondante de cristaux et, après des tâtonnements, je me suis arrêté au milieu de composition suivante :

	Parties
Bouillon	100
Peptone	1
Glucose	1
Glycérine	0,5
Asparagine.	0,3

Après neutralisation à la phénolphtaléine, on ajoute 0^{gr},050 à 0^{gr},090 de soude. On stérilise à 120° C., la gélose brunit. Ce sont les géloses colorées qui donnent les meilleurs résultats.

Les géloses de préparation ancienne, qui se sont concentrées par évaporation, pour être utilisées doivent être additionnées d'eau et stérilisées ensuite. Je ferai remarquer toutefois que des passages successifs à l'autoclave ne doivent pas être redoutés, le milieu ne faisant que se bonifier.

C'est à cette gélose que je fais appel pour maintenir à peu près constant le pouvoir chromogène de mes cultures.

Tubes de gélose inclinée. — L'ensemencement par stries de *B. chlororaphis* sur tube de gélose asparagine (à 25°-30° C.) montre des cultures visqueuses, grisâtres, plus ou moins transparentes, et gagnant rapidement toute la surface inclinée. Les cristaux apparaissent parfois dès le deuxième jour; ils débentent, en général, dans l'eau de condensation, puis, envahissent peu à peu la surface inclinée en formant tantôt quelques plages, tantôt de nombreuses petites taches vertes jaunissant à mesure que la culture vieillit.

Pomme de terre glycéinée (température 25°-30° C.). — Sur pomme de terre, la Bactérie forme d'abord un enduit visqueux, glacé, variable avec l'âge et la variété de la pomme de terre. La culture est le plus souvent jaune citron, plus rarement jaune brun ou orange. Les points verts apparaissent après quatre ou cinq jours de culture. Ils constituent, au début, des îlots ou des plaques qui peuvent, par multiplication, recouvrir en tout ou partie l'enduit jaune. Parfois, les cristaux se forment au-dessous de la couche microbienne et paraissent gris-bleu alors qu'en réalité ils sont d'un beau vert; on peut s'en rendre compte en enlevant le mince enduit qui les recouvre. Le coton glycéiné qui supporte la pomme de terre se colore généralement en jaune et est fréquemment envahi par la chlororaphine. Les cultures vieillissant, les cristaux jaunissent et l'enduit se décolore tout en restant très luisant, rarement la pomme de terre devient brunâtre.

Certaines vieilles cultures ont une odeur très nette d'acide cyanhydrique et le papier au sulfate de cuivre et au gaïac donne une coloration bleue très intense; les quantités extrêmement faibles de corps odorant ne permettent pas une identification rigoureuse.

Les pommes de terre glycéinées constituent un très bon milieu pour la conservation de la Bactérie.

Dahlia. — Le développement du Bacille varie suivant le tuber-

cule de dahlia utilisé, généralement la culture est blanc grisâtre avec de nombreux cristaux. Le coton supportant le dahlia présente une coloration allant du jaune pâle au jaune citron et montre souvent des points verts. Fréquemment, les cristaux se développent au-dessous de l'enduit microbien et donnent à la culture un aspect gris-bleu; un simple grattage suffit à les mettre en évidence. Si on effectue une série de sections sur une culture présentant des cristaux, on aperçoit, par transparence, à l'intérieur du tubercule, des taches verdâtres constituées par des amas cristallins verts.

Je n'ai jamais observé la coloration vert bleuâtre du tubercule signalée par GUIGNARD et SAUVAGEAU.

Bouillon simple. Bouillon peptoné. Bouillon peptoné glucosé. Solution de peptone. — Les cultures de *B. chlororaphis* dans tous les milieux peptonés présentent des caractères très voisins; elles ne diffèrent généralement entre elles que par un développement, une fluorescence et une production de cristaux plus ou moins intenses.

A 37° C. le trouble peut être sensible dès la septième heure. A 30° C., au bout de dix-huit à vingt heures, il atteint 1 centimètre de hauteur environ à la partie supérieure du tube de culture; le reste du liquide est limpide. Vers la vingt-quatrième heure, le trouble, plus intense, s'est propagé sur une plus grande longueur et gagne ensuite rapidement tout le tube, la culture présente un voile à la surface et est légèrement fluorescente.

Les cristaux apparaissent vers le troisième ou le quatrième jour; la fluorescence disparaît généralement au moment de leur formation et réapparaît souvent ensuite.

D'autre part, les cultures qui donnent peu ou pas de chlororaphine sont très fluorescentes, tandis que celles qui donnent des cristaux très abondants le sont peu ou même ne le sont pas du tout. Je dois ajouter que la réaction du milieu est étrangère à ce phénomène. Les cultures, généralement alcalines, ont une odeur caractéristique rappelant celle de la coumarine. En vieillissant, elles deviennent visqueuses, glaireuses et leur filtration est extrêmement pénible.

Leur viscosité est due à des substances albuminoïdes que l'on peut précipiter par la chaleur, l'acide acétique, le sulfate d'ammoniaque.

Dès que la végétation est arrêtée, les cristaux jaunissent plus ou moins rapidement.

Le bouillon simple est un assez mauvais milieu ne donnant que peu ou pas de chlororaphine. Le bouillon peptoné lui est supérieur et l'addition de glucose, de glycérine favorise la production de la chlororaphine. Les solutions de peptone à 2% se comportent sensiblement comme le bouillon peptoné correspondant.

Les peptones Defresne, Chenal et Douilhet favorisent plus particulièrement la fluorescence tandis que les peptones Chapoteaut augmentent la production des cristaux.

Il est à remarquer que les peptones suffisent au Microbe comme source d'aliments azoté, carboné et minéraux pour l'édification des cristaux, et ce fait servira à expliquer leur production dans le lait.

En bouillon peptoné, la Bactérie perd rapidement la propriété de donner des cristaux. A chaque passage, l'intensité de leur production diminue et finalement on obtient des cultures fluorescentes ne donnant plus de chlororaphine. Ces dernières présentent souvent un voile plissé et rappellent les cultures de *B. fluorescens mesentericus* (TATAROFF 1891). Cette diminution de la fonction chromogène montre la nécessité de faire des passages constants sur gélose ou gélatine et de choisir avec soin les colonies présentant les plus beaux cristaux. Je ferai remarquer à ce sujet que l'on est frappé par le nombre considérable de colonies qui ne présentent pas de cristaux et que, d'autre part, des colonies à magnifiques aiguilles vertes reportées même en entier sur bouillon peptoné ne donnent pas toujours de la chlororaphine. Cette observation tend déjà à démontrer que toutes les cellules ne sont pas également aptes à la production de la matière chromogène.

Le fait suivant conduit à la même conclusion.

Une culture récemment isolée présentant de nombreux cristaux estensemencée dans 100 ballons de milieu peptoné. On

constate que la fonction chromogène est loin de présenter dans tous la même intensité. La quantité de chlororaphine produite dans chacun des vases ensemencés est très variable et souvent elle est nulle.

On comprend aisément, par suite, que cette espèce chromogène n'ait pas suscité de plus nombreux travaux et que THIRY (1900) l'ait considérée comme perdant rapidement la propriété de donner des cristaux.

Conclusions. — La production des cristaux est donc un meilleur caractère que la forme pour la diagnose de l'espèce à la condition que la culture soit effectuée dans un milieu convenable.

CULTURES SUR MILIEUX SPÉCIAUX

Dans l'étude des cultures sur milieux spéciaux, nous nous bornerons aux réactions les plus simples et les plus caractéristiques. Le lait nous donnera l'épreuve de sa coagulation et montrera si le Bacille secrète une présure et une caséase; le blanc d'œuf indiquera s'il secrète une trypsine et la peptone donnera la réaction de l'indol.

Action sur le lait. — *Bacillus chlororaphis*, cultivé sur lait entier additionné ou non de carbonate de chaux, colore la couche crèmeuse en jaune citron. La caséine coagulée donne un précipité jaunâtre et un liquide incolore jaune sale ou jaune rougeâtre. Puis, le coagulum se transforme peu à peu en un liquide opalescent et visqueux. La liquéfaction peut être complète en quinze jours, après lesquels le liquide s'éclaircit.

Le lactose est presque entièrement respecté ainsi que l'attestent les résultats suivants qui sont les moyennes de trois séries d'expériences :

	Témoin A	Témoin B	Témoin C
Lactose, pour cent. . .	4 ^{gr} ,21	4 ^{gr} ,31	3 ^{gr} ,52
	Culture A	Culture B	Culture C
Lactose, pour cent. . .	4 ^{gr} ,19	4 ^{gr} ,26	3 ^{gr} ,29

D'autre part, le milieu reste sensiblement neutre ou alcalin pendant la durée de la coagulation et dégage une odeur rappelant celle de la coumarine.

Enfin, une culture coagulée est filtrée et le filtrat neutre est mélangé à son volume de lait frais, le tout, additionné de 2 ‰ de chlorure de calcium, est maintenu à 30° C., la coagulation du lait est rapide : le Bacille secrète donc une présure.

La peptonisation du milieu s'effectue de bonne heure comme l'indiquent les résultats suivants :

	Caséine pour 100
Témoin.	3 ^{gr} ,23
Culture de dix jours	1 ,12

Le dosage de la caséine dans de telles conditions, sans être d'une grande exactitude, est suffisamment précis pour montrer sa disparition.

A mesure que le coagulum disparaît, des albumoses et peptones apparaissent dans le milieu et ce n'est que lorsque la culture est assez riche en produits de peptonisation que les cristaux se précipitent.

On ne peut, en effet, les observer que tardivement dans les cultures, quelquefois vingt jours seulement après l'ensemencement. Comme nous savons que les peptones à elles seules sont suffisantes au Bacille pour la production de chlororaphine, il semble logique d'admettre que dans le lait les cristaux se forment aux dépens des produits de peptonisation.

Il résulte donc des observations précédentes que, *sur le lait, le Bacille secrète une présure et une caséase et ne fait pas fermenter le lactose*.

Action sur l'albumine cuite. — On peut rapprocher de la peptonisation de la caséine l'action du Bacille sur l'albumine cuite. Si onensemence *B. chlororaphis* sur des cubes de blanc d'œuf (milieu d'après GRIMBERT) (1903), on obtient des cultures fluorescentes. L'albumine devient transparente et les arêtes du cube s'émousent. Cette modification du blanc d'œuf est probablement due à la sécrétion d'une trypsine.

Recherche de l'indol et du phénol. — L'indol et le phénol sont des produits normaux de la fermentation putride ou putréfaction des matières albuminoïdes.

La recherche de l'indol et du phénol dans les cultures de *B. chlororaphis* faites en milieux peptonés, nous permettra donc de déterminer si ce microbe est capable de produire la putréfaction. Ces considérations justifient les différents essais que j'ai effectués pour mettre l'indol en évidence dans les cultures du microbe de GUIGNARD et SAUVAGEAU. Ces essais peuvent se résumer ainsi :

1° *Milieu peptoné.* — Solutions de peptones Defresne et Chapoteaut à 1 et 2 % en présence d'air et d'atmosphères de plus en plus pauvres en oxygène; cultures faites à 25° C., 30° C. et 37° C.

La recherche de l'indol a été effectuée sur des cultures de deux à quinze jours, en opérant, soit directement sur les solutions de peptones, soit sur l'extrait éthéré des cultures. Chaque expérience comportait des tubes témoins. Le nitrite de soude, la vanilline, le furfurol, la paradiméthylamidobenzaldéhyde n'ont jamais décelé de composés indoliques;

2° *Solutions de peptone additionnées de sels minéraux.* — Peptone de 5 à 10 %; phosphate de soude 0,500 %; sulfate de magnésie 0,100 %; cultures à 30° et 37° C. de deux à vingt jours.

Là encore, les réactifs précédents ne révèlent aucune trace d'indol.

Le Bacille ne produisant pas de composés indoliques, il était à prévoir qu'il ne donnerait pas non plus de composés phénoliques, c'est ce que l'expérience a vérifié.

Action sur les nitrates. Nitrate de potasse. — Certaines bactéries ne possèdent pas de propriétés réductrices vis-à-vis des nitrates alcalins, tandis que d'autres, au contraire, les réduisent en nitrites. Quelques-unes même, poussant plus loin leur action, décomposent entièrement les nitrates en laissant dégager l'azote.

Ces actions différentes des microbes sur les azotates m'ont conduit à chercher à quel groupe appartient *B. chlororaphis*.

A cet effet, j'ai suivi la technique et les procédés d'analyse indiqués par GRIMBERT (1903) en remplaçant seulement les matrass de 125 centimètres cubes par des ballons de 200 centimètres cubes; de ce fait, les résultats se rapportent à 2 grammes de nitrate.

Les cultures ont été prolongées à la température du laboratoire durant trois mois (juin, juillet, août).

La faible quantité d'oxygène que le milieu offre à la Bactérie rend la végétation très pénible. On n'observe ni cristaux, ni fluorescence. Le dégagement gazeux est lent et les cultures répandent une odeur voisine de celle de la coumarine.

Les résultats consignés dans le tableau ci-dessous permettent de se rendre compte de l'action du Bacille sur le nitrate.

	Peptone à 1 o/o	
	A	B
Nitrate au début	2 ^{gr} ,000	2 ^{gr} ,000
Nitrate détruit	0 ,508	0 ,824
Soit pour cent.	25,4	41,2
Nitrite restant.	0 ^{gr} ,105	0 ^{gr} ,079
Gaz total	56 ^{cm³} ,5	
Azote.	56 ^{cm³} ,5	
C O ₂	0	
Réaction	Très alcaline.	

Le Bacille réduit donc les nitrates en nitrites et son action peut même aller jusqu'à un dégagement d'azote. Très rarement on constate un faible dégagement de CO₂; en général, ce gaz est absorbé par la potasse pour donner du bicarbonate.

L'intensité de la réaction est très variable; le volume de gaz dégagé, dont le maximum observé est 56^{cm³},5, peut descendre à 20, 15 et 10 centimètres cubes.

L'addition de bouillon de bœuf à la solution de peptone nitratée détermine une végétation microbienne plus abondante et une destruction de nitrate beaucoup plus grande, comme l'indiquent les chiffres suivants :

	Culture A	Culture B
Nitrate détruit	1 ^{gr} ,210	1 ^{gr} ,380
Soit pour cent.	60,5	69
Nitrite restant.	0 ^{gr} ,085	0 ^{gr} ,135

Le bouillon, par lui-même, est un assez mauvais milieu de culture; néanmoins, il semble bien que la différence observée dans l'activité de la fermentation soit due à ses qualités nutritives. En effet, on ne saurait prétendre qu'il fournisse les composés azotés (aminés ou amidés) et carbonés nécessaires à une réaction secondaire de ce genre :



Le volume d'azote dégagé n'est en rien le double de celui qui correspond au nitrate disparu, comme cela a lieu lorsqu'il s'agit de ferments dénitrifiants indirects, ainsi que l'ont montré GRIMBERT et BAGROS (1909).

Le bouillon apporte donc, par ses éléments nutritifs, une nouvelle source d'énergie à la fonction réductrice du Microbe.

En résumé, *B. chlororaphis* est un dénitrifiant direct et son action sur les nitrates est de même ordre que celle de *B. pyocyaneus*; toutefois, la réaction est beaucoup plus lente.

DEUXIÈME PARTIE

CULTURES EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Dans les études précédentes, nous avons vu que *B. chlororaphis* produit deux matières chromogènes : l'une verte, fluorescente, soluble dans le milieu; l'autre verte, insoluble et cristallisée. Malgré leur ressemblance de coloration, ces deux substances ne sauraient être confondues. On peut également observer des cultures incolores, dans lesquelles les cellules se multiplient normalement. Il est intéressant de rechercher des milieux où aucune coloration n'apparaît et d'autres où la Bactérie produit une des matières chromogènes à l'exclusion de l'autre. On obtient ainsi trois aspects différents du mode de vie du Bacille.

Nous verrons que les compositions des milieux nécessaires à l'obtention de cultures incolores, à la production de la fluorescence et à la formation des cristaux, peuvent se ramener aux schémas suivants :

Schémas de la composition des milieux nécessaires à l'obtention de cultures

I. — INCOLORES	II. — FLUORESCENTES	III. — A CRISTAUX
Éléments minéraux. Source de N minérale. Élément hydrocarboné.	Éléments minéraux. Source de N organique.	Éléments minéraux. Source de N organique. Élément hydrocarboné. Fer.

Les types I et II correspondent à des cultures appauvries. Ce fait s'explique aisément. En effet, si en I la Bactérie a à sa disposition un élément hydrocarboné, en revanche l'élément azoté ne lui convient que médiocrement. En II le Bacille trouve un aliment azoté très favorable, mais qui ne saurait compenser, par ses qualités nutritives, la suppression de l'élément hydrocarboné.

Seul le type III, renfermant l'aliment azoté favorable, l'aliment hydrocarboné et le fer, donne des cultures à végétation active et même exubérante.

Ayant plus particulièrement en vue l'étude de la chlororaphine, je n'ai pas l'intention de faire ici l'étude complète de la fonction fluorescigène et des exigences nutritives des cultures incolores. Ces études, à elles seules, peuvent demander plusieurs années de recherches. Je me bornerai donc à mentionner certaines observations que j'ai été amené à faire lors de la recherche d'un milieu favorable à la production des cristaux verts.

Pour tous les essais que je vais rapporter j'utilisais l'eau bidistillée et la verrerie d'Iéna.

CULTURES INCOLORES

La composition du milieu permettant la végétation bactérienne et qui ne donne lieu à aucune manifestation des fonctions chromogènes est la suivante :

Sulfate d'ammoniaque (1)	1
Phosphate dipotassique	0,100
Sulfate de magnésie.	0,500
Chlorure de calcium.	0,040
Glycérine	2
Eau.	100

A la température de 25°, le développement est assez abondant. Il y a formation d'un voile et l'examen microscopique

(1) Le sulfate d'ammoniaque peut être remplacé par le tartrate, le nitrate d'ammoniaque.

montre des éléments normaux. La végétation est néanmoins de courte durée. Les cultures ainsi obtenues sont considérablement différentes des louchissements des milieux pauvres en phosphates que nous aurons l'occasion d'observer dans l'étude de la fluorescence et qui montrent des bacilles allongés à grains métachromatiques nombreux et parfois même des formes irrégulières.

Je n'étudierai pas, dans ce milieu, l'influence de chaque élément sur la végétation, car les cultures incolores n'intéressent qu'indirectement la production de la chlororaphine, je les cite plutôt à titre de curiosité scientifique.

ÉTUDE DE LA FONCTION FLUORESCIGÈNE

Ensemencé dans les milieux favorables à la production de la substance fluorescente, *B. chlororaphis* donne un faible développement bactérien avec éclaircissement rapide du milieu. Celui-ci devient généralement alcalin, mais son alcalinité est extrêmement variable. Telle est l'allure générale d'une culture fluorescente; je vais maintenant essayer d'indiquer les causes qui régissent la fonction fluorescigène.

GESSARD, dont le nom est intimement lié à l'histoire des bacilles chromogènes, indique, comme milieu de culture de composition minimum pour les bacilles fluorescents, le type suivant :

Succinate d'ammoniaque	1
Phosphate de potasse	0,5
Eau	100

Le *B. chlororaphis*, ensemencé sur ce milieu, donne une culture faible, sans voile ou à voile réduit à une très mince pelli-cule. La végétation dure peu de jours et la fluorescence est variable suivant la semence, quelquefois même nulle; jamais on n'observe de cristaux.

La végétation du Bacille dans un tel milieu impliquerait, semble-t-il, que la cellule peut vivre en l'absence de certains

éléments (le soufre, par exemple) que l'on considère en général comme indispensables à son élaboration. DUCLAUX fait remarquer que « l'existence d'un végétal se passant de soufre pour ses besoins alimentaires impliquerait l'existence d'un protoplasme sans soufre aussi, et on n'en connaît point de pareil ».

A quoi la Bactérie emprunte-t-elle le soufre dans le milieu succinate d'ammoniaque, phosphate de potasse? A la semence initiale? Le fait est possible, quoique je n'apporte qu'un très petit nombre de cellules, car on sait que les cellules mortes, macérant, peuvent être attaquées et dissoutes par les ferments (trypsines) produits dans les cultures. Cependant, cette explication, citée souvent, est bien peu satisfaisante et il y a lieu de chercher ailleurs les origines du soufre.

MEYER, dans ses recherches sur la nutrition des levures, avait vu le soufre apporté par le sucre; j'ai donc recherché ce métal-loïde dans le succinate d'ammoniaque. Le phosphate de potasse avait d'ailleurs été préparé en partant de potasse et d'acide phosphorique reconnus exempts de soufre par l'analyse chimique.

Le succinate d'ammoniaque utilisé, vendu comme produit chimiquement pur *pro analysi*, donne, à la calcination, 22 milligrammes de cendres par 100 grammes. En opérant sur une assez grande quantité de cendres, on caractérise le soufre, la magnésie et un peu de calcium. Si on soumet ce succinate à des purifications successives, on s'aperçoit que plus le produit obtenu est pauvre en cendres, plus les cultures deviennent difficiles et que l'addition de soufre et de magnésie à ces produits purifiés favorise la végétation et la fluorescence. Je n'ai pu obtenir de succinate d'ammoniaque rigoureusement exempt de cendres, il ne m'a donc pas été donné de vérifier expérimentalement si le Bacille se développait en milieu dépourvu de soufre. Mais nous verrons que la Bactérie a besoin de doses relativement grandes de soufre et de magnésie, pour donner un voile épais et des cristaux. Il semble donc probable que si on arrivait à priver totalement le Bacille de soufre et de magnésie, il ne se reproduirait plus. L'organisme paraît avoir la faculté de se

contenter de très peu de ces éléments dans certaines circonstances, mais lorsqu'il les rencontre autour de lui, il manifeste ses conditions de vie facile par une exubérance de développement.

Si l'on ne peut concevoir de végétation en l'absence de soufre, *a priori* il semble qu'une cellule ne peut vivre en l'absence de phosphore. PASTEUR a depuis longtemps, en effet, insisté sur la nécessité de l'acide phosphorique dans les milieux de culture.

Cependant GESSARD a vu le *B. pyocyaneus* se développer et donner de la pyocyanine en l'absence de phosphore. Mais l'auteur a-t-il bien pris les précautions nécessaires pour éviter tout apport de ce métalloïde? Le *B. chlororaphis*, dans un milieu dépourvu de phosphate, ne se multiplie pas. Il exige même des doses relativement élevées d'acide phosphorique. Au-dessous de 5 milligrammes de $\text{PO}_4 \text{K}_2 \text{H} \%$ il n'y a aucun développement, même après plusieurs semaines. A 15 milligrammes, 60 % des ballons ensemencés sont fluorescents, 20 % sont incolores et 20 % stériles. A partir de 30 milligrammes, la fluorescence se développe régulièrement dans tous les ballons et ne semble pas augmenter avec des doses supérieures (50-100-200 milligrammes). La dose de 15 milligrammes de $\text{PO}_4 \text{K}_2 \text{H}$ semble donc être au voisinage de la dose minimum compatible avec la vie de la Bactérie.

Nous sommes loin de la sensibilité du *B. pyocyaneus* qui peut déceler 1/8000 de phosphate de potasse par la manifestation de sa fonction chromogène. Cette sensibilité avait permis à GESSARD de montrer l'existence d'une proportion de phosphate constituant « *une sorte de ration d'entretien* » indispensable à la vie du Microbe. La quantité de phosphate qu'on apporte en plus dans son milieu de culture ne serait alors pas nécessaire; elle constituerait une réserve que le Bacille mettrait à profit pour la production de la fluorescence.

A ce sujet, je ferai remarquer que CATHELINEAU (1896), étudiant *B. viridis* (LESAGE), n'a pu vérifier ce rôle important des phosphates dans la manifestation de la fonction fluorescente.

BACILLUS CHLORORAPHIS SEMBLE-T-IL
SE COMPORTER COMME BACILLUS PYOCYANEUS ?

Aux doses de 15 milligrammes de phosphate de potasse, nous avons vu des cultures incolores et des ballons rester stériles; de même certaines semences ont pu donner un faible développement avec ou sans fluorescence dans des milieux renfermant 10, 11, 12 milligrammes de $\text{PO}_4 \text{K}_2 \text{H}$.

Cela tient à ce que les exigences en acide phosphorique varient avec les cellules. En effet, les cultures incolores ensemencées dans un milieu plus riche en phosphore donnent de la fluorescence et ces cultures fluorescentes, reportées en milieu primitif plus pauvre en phosphate, n'en donnent plus. Ce fait correspond bien à l'idée de deux doses : une indispensable au développement et une supplémentaire déterminant l'apparition de la fonction fluorescigène. Mais, si on examine les cultures restées incolores, on voit qu'elles sont beaucoup plus maigres que les cultures fluorescentes.

D'autre part, l'examen microscopique montre des éléments allongés, peu ou pas mobiles, à grains métachromatiques nombreux; on a l'impression que la cellule vit difficilement et qu'elle traduit cette difficulté de végétation par la disparition de sa fonction fluorescigène. D'ailleurs, nous voyons disparaître la fluorescence des cultures chaque fois qu'un agent quelconque diminue l'activité végétative. Et on peut citer, comme exemple de ce genre, les cultures faites à la température de 37° ou effectuées dans une atmosphère pauvre en oxygène, ou encore en milieu trop alcalin, etc...

Il est un élément du milieu que je n'ai pas encore étudié : c'est l'aliment azoté dont l'importance a été mise en évidence par LEPIERRE (1895) dans ses belles recherches sur la fonction fluorescigène.

CESSARD (1892) a montré que la prédominance de l'aliment azoté se traduit par la production de la pyocyanine et celle des

phosphates par la fluorescence. C'est ce qui m'a amené à cultiver *B. chlororaphis* en milieu suivant :

Asparagine,
Sulfate de magnésie,
Phosphate de potasse,
Eau,

dans lequel on fait varier le phosphate de 30 milligrammes à 500 milligrammes et l'asparagine de 0^{gr},4 à 2^{gr},1 % (l'asparagine à 0^{gr},7 % donne sensiblement les mêmes résultats que le succinate d'ammoniaque à 1 %). Je n'ai jamais observé la formation d'un seul cristal vert et la fluorescence n'a paru présenter aucune modification intéressante.

Enfin, je n'ai pu obtenir de développement de la Bactérie avec d'autres sources d'azote telles que l'urée, le glycocolle, le tartrate ou le lactate d'ammoniaque.

Influence du fer. — Nous verrons dans l'étude de la production de la chlororaphine l'influence considérable du fer; aussi, ai-je essayé d'additionner de sulfate ferreux le milieu précédent.

En présence du fer, le Bacille donne une culture fréquemment fluorescente, mais qui, au bout de deux ou trois jours d'ensemencement, devient jaunâtre et perd sa fluorescence. Parfois les cultures sont jaunes dès le début. La réaction du milieu est étrangère à ce phénomène ainsi qu'en témoignent les chiffres suivants :

Alcalinité du milieu à l'appari-	
tion de la fluorescence . . .	0 ^{gr} ,049 (en H ₂ SO ₄ %)
Alcalinité du milieu à la dispa-	
rition de la fluorescence . .	0 ^{gr} ,098 (en H ₂ SO ₄ %)

L'alcalinité a doublé et cependant la fluorescence a disparu. Il faut donc chercher ailleurs l'explication de ce phénomène. A cet effet, des cultures jaunes, âgées seulement de trois ou quatre jours, sont filtrées et additionnées d'un excès d'ammoniaque. La base ne détermine pas instantanément l'apparition de la

fluorescence de la culture. La liqueur ainsi alcalinisée louchit et après quelques heures, il se dépose au fond du vase un précipité floconneux, surmonté d'un liquide très fluorescent qui devient incolore au bout de quelques jours.

Il semble donc que la coloration jaune des cultures soit due à une combinaison du chromogène fluorescent et du fer.

Action de différentes substances sur la fonction fluorescigène.

— L'addition d'alcool méthylique, éthylique ou de glycol au milieu nutritif n'a pas d'action sensible sur la fluorescence. Par contre, les sucres ont une influence variable suivant leur nature et celle de l'aliment azoté qui leur est associé; tous favorisent le développement bactérien. Il en est de même de la glycérine. On peut donc prévoir que la présence d'un aliment hydrocarboné permettra à la Bactérie d'utiliser des sources d'azote autres que l'asparagine et le succinate d'ammoniaque. Le milieu employé sera le suivant :

Source d'azote.	1
Sulfate de magnésie	0,05
Phosphate dipotassique.	0,10
Chlorure de calcium	0,04
Alcool ou sucre	2
Eau	100

L'importance du chlorure de calcium dans ce milieu est assez discutable; dans certains cas, sa suppression transforme la fluorescence verte habituelle en une faible fluorescence bleue; dans d'autres, son absence passe complètement inaperçue. La nécessité des autres éléments minéraux a été discutée précédemment, je n'y reviendrai donc pas.

L'aliment hydrocarboné étant représenté par la glycérine, la Bactérie donne des cultures fluorescentes avec l'urée, l'acide aspartique; incolores avec le glycocole, le tartrate, le sulfate, le nitrate d'ammoniaque et le nitrate de potasse. Les milieux à urée et glucose, donnent une culture fluorescente vert pomme, admirable. Parmi les sources d'azote qui viennent d'être indiquées, le glycocole méritait de fixer l'attention, car nous verrons

qu'en présence de fer, il permet la production des cristaux verts. J'ai donc essayé de faire produire de la substance fluorescente à la Bactérie avec cette source d'azote. A cet effet, l'aliment hydrocarboné a été fourni successivement par des alcools (diols, triols, tétrols, hexols), des sucres (hexoses, disaccharides). Dans chaque milieu ainsi obtenu, les doses de glycocolle, de phosphate de potasse et même des autres éléments, ont été extrêmement variées, sans que jamais le Bacille ait donné de cultures fluorescentes.

Action de la température et de l'oxygène. — La température la plus favorable à la production de la fluorescence est voisine de 22-24° C. et les plus belles cultures fluorescentes s'obtiennent en étalant la couche de liquideensemencé. La fonction fluorescigène ne se manifeste plus vers 36-37° C. ; quelques rares semences peuvent cependant donner encore, à cette température, des cultures fluorescentes. Suivant le degré de pauvreté de l'atmosphère en oxygène, la fonction fluorescigène est entravée ou supprimée.

CONCLUSIONS

Les procédés analytiques n'étant pas assez sensibles pour nous assurer que des traces extrêmement faibles de soufre n'existent pas dans un milieu, je n'ai pas pu vérifier si l'absence de soufre empêche le développement de *B. chlororaphis*. Il semble que cet élément lui est nécessaire, mais que des quantités très faibles peuvent lui suffire. Il en est autrement en ce qui concerne le phosphore; il est nécessaire que le milieu en renferme une quantité pondérable pour que le Bacille puisse s'y développer.

GESSARD (1892) dans son mémoire sur la fonction fluorescigène montre que la production de la fluorescence est intimement liée à la présence de phosphates dans le milieu de culture et il n'attribue qu'un rôle secondaire à la nature de l'aliment azoté. Cette opinion ne paraît pas exacte en ce qui concerne *B. chlororaphis* et je crois pouvoir conclure, ainsi que LÉPIERRE (1895)

l'a fait pour un bacille fluorescent, que la production de la fluorescence dépend de circonstances multiples. Elle est influencée par la nature de l'élément azoté, par celle de l'aliment carboné, par les proportions relatives des aliments azoté, carboné et minéraux entre eux. L'augmentation de phosphate au delà de la quantité nécessaire pour assurer le développement normal ne semble pas exercer sur cette fonction une influence notable. D'autre part, l'addition de traces d'éléments, tels que le fer, peut masquer la fluorescence par une action secondaire sans empêcher la production de matière fluorescente. Enfin les doses d'éléments nutritifs nécessaires à la cellule pour manifester sa fonction fluorescigène sont variables avec les semences.

CONDITIONS DE PRODUCTION DE LA CHLORORAPHINE

MILIEU DE CULTURE (MILIEU SYNTHÉTIQUE TYPE)

Les milieux synthétiques que je viens d'examiner ne permettent pas l'obtention des cristaux verts. J'ai donc essayé si l'introduction d'éléments nouveaux ne déterminerait pas leur formation. Après de longs tâtonnements, j'ai réalisé un milieu chimiquement défini, où une semence déterminée produit, en un temps donné, un poids maximum et à peu près constant de substance verte. Ces recherches nombreuses sont d'ailleurs pleinement justifiées, d'une part, par le fait que les bouillons peptonés conviennent mal à la production de la chlororaphine et que, d'autre part, en ces milieux à base de peptone, il est très difficile, sinon impossible, de suivre l'analyse des phénomènes physiologiques. La composition du milieu synthétique type adopté est la suivante :

Eau	100gr,000
Asparagine	0 ,700
Glycérine	2 ,500
Phosphate dipotassique	0 ,100
Sulfate de magnésie	0 ,500
Chlorure de calcium	0 ,040
Sulfate ferreux	0 ,010

L'eau distillée du laboratoire est redistillée dans un appareil en verre et sous pression réduite. Les produits chimiques, soumis à une purification aussi sévère que possible, doivent être rigoureusement exempts de traces de fer décelable par les réactifs. La dissolution des différents éléments du milieu étant effectuée, on obtient une liqueur que l'on peut à volonté, soit légèrement acidifier (acidité voisine de $0^{\text{gr}},030$ exprimée en H_2SO_4), soit laisser neutre, soit alcaliniser faiblement (alcalinité voisine de $0^{\text{gr}},030$ exprimée en H_2SO_4 et déterminée en présence de phénolphtaléine). Les milieux alcalins sont propres à une végétation rapide, mais de courte durée, car nous verrons que la Bactérie alcalinise le milieu et qu'une certaine alcalinité s'oppose à la multiplication bactérienne. Il s'ensuit donc que les milieux neutres ou acides permettront une végétation plus longuement soutenue.

Le bouillon est distribué dans des ballons. L'avidité de la Bactérie pour l'oxygène exige que le liquide nutritif soit mis en couche mince. On obtient ce résultat en introduisant dans les ballons une quantité de liquide telle qu'elle représente le sixième ou mieux le septième de la capacité totale du récipient. Les vases de culture utilisés sont en verre d'Iéna. Enfin, le milieu est stérilisé à 115° . L'ensemencement est effectué avec des cultures de deux à trois jours au maximum et présentant déjà des cristaux. Ce dernier caractère n'est pas à négliger, car nous verrons plus loin que certaines races produisent la chlororaphine plus abondamment que d'autres. En empruntant la semence à une culture qui présente déjà des formes cristallines, on est donc plus certain de s'adresser à une race favorable.

A la température de 25°C ., *B. chlororaphis* ensemencé dans le milieu cité donne une culture offrant trois caractéristiques principales : développement bactérien avec voile épais ; production de cristaux verts ; éclaircissement du milieu et jaunissement des formes cristallines. Accessoirement, on note parfois une légère et éphémère fluorescence. On observe fréquemment une troisième substance chromogène soluble dans le milieu et variant du jaune pâle au jaune citron. Enfin, exceptionnellement, les cultures peuvent être de couleur brune plus ou moins foncée.

Douze à quinze heures après l'ensemencement, la partie supérieure du milieu offre l'aspect d'un louche blanc laiteux, la partie inférieure du liquide restant limpide.

Au bout de vingt-quatre heures, la culture est entièrement trouble et présente un voile; quelquefois, on perçoit à la surface une couche fluorescente de 5 à 6 millimètres (fluorescence qui, d'ailleurs, disparaît bientôt).

La culture vieillissant, le voile s'épaissit et les cristaux verts apparaissent. Parfois, on observe l'apparition des formes cristallines le deuxième jour, mais généralement c'est vers le troisième ou quatrième jour que la chlororaphine se précipite. On constate fréquemment, avant l'apparition des cristaux, que le milieu présente une coloration jaune, dont l'intensité et la nuance sont variables. Il semble que l'intensité de cette coloration diminue à mesure que s'effectue la précipitation des cristaux, sans que, pour cela, elle disparaisse complètement.

Enfin, la végétation s'arrête, le bouillon s'éclaircit et les cristaux verts jaunissent peu à peu. La culture est alors alcaline, elle dégage une odeur pénétrante, caractéristique, parfois partiellement masquée par celle de l'ammoniaque.

Le corps odorant, que nous retrouverons dans les produits de distillation de la culture, est différent de ceux que nous avons eu l'occasion d'étudier jusqu'ici et dont l'odeur se rapprochait de celle de la coumarine.

On peut observer exceptionnellement des cultures présentant de bonne heure une légère teinte brune qui, allant en s'accroissant, aboutit au brunissement complet du milieu. Dans de telles cultures, le développement est normal; mais la production des cristaux est sensiblement inférieure à celle des cultures types décrites plus haut. Il est à noter que toutes les cultures brunes ont présenté, au début de leur développement, une fluorescence plus ou moins marquée. Ce fait est intéressant à constater, car il nous aidera à interpréter le mécanisme du brunissement de différents milieux.

J'ai eu l'occasion de qualifier de *favorable* ce milieu; en effet, la Bactérie y offre une végétation active et relativement de longue

durée. La vitalité et la faculté de produire des cristaux s'y conservent infiniment mieux qu'en bouillon peptoné. Enfin, le quantum de chlororaphine produit dépasse considérablement celui que le Microbe fournit avec les peptones.

Maintenant que nous connaissons l'allure générale d'une culture, nous allons rechercher l'utilité de chaque élément du milieu dans la production des cristaux verts.

Aliment azoté. — La suppression de l'aliment azoté empêche tout développement bactérien. Avec des quantités d'asparagine inférieures à 0^{gr},7, la production des cristaux et le développement de la Bactérie diminuent notablement, tandis que l'apport de quantités supérieures à 1 gramme favorise la végétation, mais n'influence guère la formation de chlororaphine. On peut substituer à l'asparagine, l'urée, l'acide aspartique, le glyocolle, le succinate d'ammoniaque. Par contre, les tartrate, lactate, sulfate, nitrate d'ammoniaque ne permettent pas l'obtention de cristaux.

Aliment hydrocarboné. — En l'absence de glycérine, la Bactérie donne des cultures souvent fluorescentes pendant quelques jours; le développement microbien est faible et le voile fait défaut ou est réduit à une mince pellicule; on n'observe jamais de cristaux. Des apports de glycérine inférieurs à 2 grammes déterminent une faible production de cristaux et la quantité de chlororaphine produite s'accroît avec l'apport, mais les doses de 4, 5, 10 grammes n'augmentent plus sensiblement le poids de substance verte. La glycérine est donc indispensable à la production de chlororaphine et à une végétation active.

On peut remplacer la glycérine par la mannite, le glucose, le lévulose et le saccharose. Les alcools méthylique, éthylique, le glycol, la dulcité, l'arabinose, le rhamnose, le lactose, le maltose, l'inuline, la dextrine, l'amidon ne permettent jamais la production de cristaux. Enfin, le mannose et le galactose présentent des propriétés spéciales que nous aurons l'occasion d'étudier plus loin.

Éléments minéraux. — *Phosphate de potasse.* — La Bactérie ne peut se développer en l'absence de l'acide phosphorique. Dès que le milieu renferme environ 50 milligrammes de phosphate de potasse, on constate la précipitation de cristaux verts. La production de chlororaphine augmente sensiblement jusqu'à 100 milligrammes, mais des quantités supérieures à cette dose ne semblent pas influencer la fonction chromogène. La dose optima est donc voisine de 100 milligrammes.

L'apport de phosphore organique par des glucoses impurs, des glycérophosphates de sodium, de potassium, de magnésium ne donne pas de résultats supérieurs à ceux fournis par le phosphate de potassium. La production des cristaux est, au contraire, généralement inférieure; tandis que SIMON (1908), dans son étude sur le *B. syncyanus*, obtenait les meilleurs résultats avec les glucoses impurs. Le phosphate de soude donne de mauvais rendements, mais associé à une trace de potasse ou de sels potassiques, il permet une aussi belle production de chlororaphine que le phosphate de potassium.

Sulfate de magnésie. — *B. chlororaphis*, dans un milieu où l'on supprime le sulfate de magnésie, donne des cultures incolores, à voile faible, ne présentant jamais de cristaux. La dose optima de ce sel est voisine de 0^{gr},500. Le sel magnésien agit-il par son acide, par sa base, ou a-t-il une action spécifique?

A cet effet, j'ai substitué au sulfate de magnésie différents composés magnésiens. Avec le chlorure de magnésium, on obtient des cultures jaunes présentant de très rares cristaux ou dépourvues de formes cristallines. Mais la réduction de la culture filtrée, par le zinc et l'acide chlorhydrique, fait apparaître une belle coloration verte. Avec le succinate de magnésie, la Bactérie offre des cultures jaunes à cristaux peu nombreux. La réduction, effectuée comme ci-dessus, donne une belle teinte verte à la culture.

Enfin, le phosphate de magnésie donne des cultures incolores. Les sulfates alcalins, le sulfate d'ammoniaque ne permettent pas la production des cristaux. En étudiant le mécanisme de formation des cristaux verts, nous verrons qu'ils sont solubles dans les acides et dérivent par réduction d'une substance jaune,

soluble dans l'eau. Cette substance s'est formée dans les milieux à chlorure et à succinate de magnésium, et c'est elle qui a donné à la culture sa coloration jaune. Les deux sels de magnésium considérés peuvent donc permettre la formation de la substance mère des cristaux verts, mais ils ne paraissent pouvoir assurer la seconde transformation : sa réduction, et, par suite, la précipitation de la chlororaphine.

Il résulte donc que le magnésium est indispensable à la production des cristaux et que, seul, le sulfate de magnésium donne des résultats constants. Cette observation est à rapprocher de celle faite par KUNTZ (1900), qui montre que le soufre et le magnésium sont indispensables à la formation du pigment chez *B. prodigiosus*. SAMKOW (1903), dans une autre étude, confirme l'influence des sels de magnésium sur la fonction chromogène de *B. prodigiosus*. Enfin, SULLIVAN (1905) montre que la présence de sulfate de magnésie est nécessaire à la formation des pigments rouges produits par *B. prodigiosus*, *B. rosaceus metalloïdes*, *B. ruber balticus* et des pigments violets de *B. violaceus*, *B. janthinus*. De tous ces faits, il semble résulter que des bactéries diverses, pour l'élaboration de substances absolument différentes, ont des exigences communes. Celles-ci peuvent, non seulement être d'ordre qualitatif, mais encore d'ordre quantitatif. Ainsi, SIMON (1908) montre que la dose optima de sulfate de magnésie est comprise entre $0^{\text{gr}},4$ et $0^{\text{gr}},5$ pour *B. syncyanus*, alors qu'elle est voisine de $0^{\text{gr}},5$ pour *B. chlororaphis*.

Ces rapprochements seraient dépourvus d'intérêt si le rôle du sulfate de magnésium dans le milieu de culture que j'ai décrit était établi. Or, si j'ai pu montrer son utilité, je n'ai pas mentionné son rôle. Le magnésium entre-t-il dans la composition de la substance chromogène? SAMKOW a essayé, mais en vain, de le déceler dans le pigment du *B. prodigiosus* et je n'ai pas été plus heureux avec la *chlororaphine*. Que le sulfate de magnésie joue un rôle dans la nutrition de la cellule, le fait est à peu près certain; mais que son rôle soit aussi simple, cela est bien peu probable. En effet, nous avons vu la cellule se contenter de quantités si faibles de chaque élément, qu'un apport de $0^{\text{gr}},500$ (dose

optimal) peut paraître exagéré pour assurer simplement la nutrition de l'organisme. D'autre part, l'action singulièrement favorisante du sulfate de magnésie comparativement à celle exercée par les autres sels de magnésium, l'impossibilité où l'on est de remplacer le sulfate de magnésie par l'association d'un sulfate et d'un sel de magnésium, montrent une influence spécifique due au sulfate de magnésie.

Chlorure de calcium. — Le chlorure de calcium semble favoriser la production des cristaux. En son absence, les cultures ne présentent pas de chlororaphine, ou n'en présentent que de faibles quantités.

Les chlorures de sodium, de potassium ne peuvent remplacer le chlorure de calcium. Une conclusion rigoureuse sur l'utilité du chlorure de calcium ne peut être donnée qu'en opérant sur un milieu absolument privé de calcium. Or, il est possible que, malgré toutes les purifications auxquelles j'ai soumis les différents éléments, le milieu renferme des traces de ce métal, insuffisantes pour être décelées par les réactifs chimiques utilisés, mais suffisantes pour satisfaire aux exigences de la Bactérie.

Sulfate ferreux. — Si une quantité très faible de calcium est suffisante pour assurer la fonction chromogène de *B. chlororaphis*, il n'en est plus de même en ce qui concerne le fer; celui-ci doit se trouver en quantité pondérable dans le milieu pour que l'on puisse obtenir une quantité appréciable de chlororaphine.

Les doses de sulfate ferreux qui donnent les meilleurs résultats sont comprises entre 4 et 12 milligrammes, mais on peut les abaisser notablement; ainsi l'apport de 1 milligramme de sel de fer permet d'obtenir, d'une façon constante, la chlororaphine. On obtient encore quelques cristaux en ajoutant seulement $0^{mg} 05$, mais des quantités de sulfate ferreux inférieures ($0^{mg} 03$) ne favorisent plus la production de la substance verte. La présence du sulfate ferreux dans un milieu défini favorisant la production de la substance chromogène, on peut se demander sous quel état agit le fer. Le fer ajouté au milieu se précipite et il n'en reste en solution que des doses très faibles, insuffisantes pour déterminer la formation régulière et abondante de la chlororaphine (pour

10 milligrammes de sulfate ferreux, il ne reste que $0^{\text{mgr}},03$ à $0^{\text{mgr}},04$ de fer dissous). Il faut donc admettre que le fer précipité primitivement dans le milieu agit favorablement. A l'appui de cette interprétation, il convient de noter que du fer se redissout peu à peu à mesure que la végétation se poursuit dans les cultures. La quantité de fer qui se dissout à nouveau peut atteindre 5 à 8 milligrammes (exprimés en sulfate ferreux). Ce fer, qui repasse en solution, donne les réactions des sels au minimum.

Le sulfate ferreux agit par sa base; en effet, on peut remplacer ce sel par le citrate ferreux ou le chlorure ferrique; néanmoins le sulfate semble préférable.

L'action du fer est spécifique; j'ai, en effet, essayé sans succès le manganèse, le nickel, le cobalt, le zinc, le chrome et le bore, à des doses variant de 0,1 à 80 milligrammes.

Nous avons vu que si l'on ajoute seulement $0^{\text{mgr}},3$ de sulfate ferreux, il n'y a plus production de chlororaphine; ce fait tend déjà à montrer que le fer est indispensable à sa formation. D'autre part, si, à des cultures faites dans un milieu dépourvu de fer, on ajoute cet élément après un, deux, trois, quatre, cinq, ...quinze jours d'ensemencement, on constate un regain de végétation et une production de substance verte. Cet apport ne doit cependant pas être fait trop tardivement sous peine d'insuccès. Chaque culture a, en effet, ses besoins particuliers: telle semence exigera que le fer soit additionné, au milieu, au plus tard le troisième jour après l'ensemencement; telle autre se contentera d'un apport fait le cinquième ou le sixième jour. Il est donc impossible de fixer une date limite aux apports tardifs de sulfate ferreux.

Les cultures sur milieux ne renfermant pas de fer sont fluorescentes, le voile n'existe pas ou est réduit à une mince pellicule et il n'y a pas formation de chlororaphine.

Par quel mécanisme agit le fer? Jusqu'à présent, à mon avis, et dans le même ordre d'idées, on n'a étudié l'action du fer que dans les cultures de l'*Aspergillus niger*. RAULIN (1870), dans son étude classique, admet que « par le fait même du développement de l'*Aspergillus* en l'absence des sels de fer, il a dû se former une

substance vénéneuse pour la Mucédinée, substance que les sels de fer empêchent de se produire, mais ne peuvent détruire». Pour LINOSSIER (1890-1891), l'apport de fer au milieu de Raulin favorise la sporulation en apportant un élément indispensable qui entre dans la composition du pigment des spores. Enfin SAUTON (1910) explique le rôle du fer en montrant que non seulement ce métal, mais aussi l'oxygène, semblent nécessaires pour la sporulation. Pour lui, la formation des spores paraît s'accompagner d'une fixation d'oxygène par un phénomène analogue à celui de WOLF (1909-1910). Et il émet l'hypothèse que le fer agit comme porteur d'oxygène dans le liquide de Raulin.

Ces tentatives d'explications sur le rôle du fer dans les cultures de l'*Aspergillus* ne permettent pas de se rendre compte d'une façon satisfaisante de l'influence de ce métal sur la production de la chlororaphine. En effet, on ne peut guère admettre la formation d'une substance vénéneuse dans les cultures (*explication de Raulin*). Seul, le fait qu'un apport trop tardif de fer ne favorise plus la végétation et la formation des cristaux, pourrait permettre de supposer la présence de produits microbiens tels que l'ammoniaque (très toxique pour le Bacille). Il faudrait alors admettre que la Bactérie attaque différemment l'élément azoté et carboné suivant qu'il y a absence ou présence de fer. Il est, en effet, des cas où la présence du fer semble influencer sur la fermentation, tel est l'exemple indiqué par le tableau ci-dessous :

NATURE du milieu analysé	ALCALINITÉ en H ₂ SO ₄	AMMONIAQUE avant hydrolyse exprimé en N	AZOTE TOTAL	GLUCOSE
	grammes	grammes	grammes	grammes
Témoin	0,0098	0,0021	0,126	1,88
Culture 9 jours avec fer, nombreux cris- taux.	0,0001	0,0455	0,1148	0,52
Culture 9 jours sans fer, pas de cristaux.	0,0882	0,060	0,124	1,48

Tous les chiffres se rapportent à 100 centimètres cubes d'un

bouillon où la glycérine a été remplacée par du glucose. L'examen des résultats analytiques montre que le milieu dépourvu de fer a une alcalinité très forte, l'hydrolyse de l'asparagine est accentuée et le glucose peu attaqué, tandis que la culture renfermant du fer a une réaction sensiblement neutre. L'asparagine est plus faiblement hydrolysée, mais le glucose a fermenté beaucoup plus activement.

L'action du fer sur la fermentation semble donc indéniable. Mais cette conclusion n'est pas susceptible de généralisation, elle ne peut pas être appliquée à tous les milieux, et, de ce fait, elle perd toute sa valeur.

L'interprétation donnée par LINOSSIER ne paraît pas plus adéquate, car je n'ai pas pu déceler de fer dans 100 milligrammes de chlororaphine. Enfin, si j'ai pu constater, ainsi que SAUTON l'a fait pour l'*Aspergillus*, que la présence simultanée du fer et de l'oxygène est indispensable à la production des cristaux, il me semble difficile d'attribuer simplement au fer le rôle de porteur d'oxygène, ce rôle est beaucoup plus complexe; nous verrons, en effet, le fer intervenir encore dans le brunissement de certaines cultures.

Quoi qu'il en soit, de tous ces essais d'explication, un fait reste acquis, c'est que la présence de fer dans les milieux chimiquement définis est indispensable à la production de la chlororaphine.

L'étude physiologique du milieu synthétique propre à la formation de la chlororaphine exige la solution de deux ordres de questions. Il faut montrer l'influence des éléments de ce milieu et déterminer le rôle de chacun d'eux. La première question a été résolue, sauf en ce qui concerne le chlorure de calcium: nous avons vu simplement que ce sel favorise la production de la chlororaphine, mais il n'a pas été démontré qu'il soit indispensable. Quant à la deuxième, je n'ai fait que l'effleurer. RAULIN (1870) a imaginé une méthode de vérification de l'utilité des éléments nutritifs, qui consiste en leur apport tardif; appliquée au milieu qui nous intéresse, elle a confirmé les résultats obtenus précédemment, mais n'a conduit à aucun aperçu nouveau sur leur rôle physiologique.

L'étude de la transformation des éléments du milieu seul nous renseignera sur le rôle de l'aliment azoté et hydrocarboné ainsi que nous le verrons plus loin.

RÉSUMÉ

En résumé, sur milieu synthétique *B. chlororaphis* peut donner plusieurs substances chromogènes qui peuvent se résumer ainsi :

Substance chromogène	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Soluble} \\ \text{dans le milieu} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \textit{Fluorescente, peu abondante, éphé-} \\ \textit{mère, assez rare.} \end{array} \right.$
		$\left\{ \begin{array}{l} \textit{Jaune, assez fréquente.} \\ \textit{Brune, rare.} \end{array} \right.$
	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Insoluble} \\ \text{dans le milieu} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \textit{Cristalline, verte ou jaune, constante.} \end{array} \right.$

L'asparagine, le phosphate de potasse, la glycérine, le sulfate de magnésie et le sulfate ferreux sont indispensables à la production des cristaux, le chlorure de calcium la favorise.

CULTURE DE DIVERSES BACTÉRIES CHROMOGÈNES EN MILIEU SYNTHÉTIQUE TYPE

La composition du milieu synthétique type que j'ai étudié répond aux exigences de *B. chlororaphis*, il ne saurait, *a priori*, constituer un milieu favorable pour d'autres microbes chromogènes. Néanmoins, j'ai essayé d'y cultiver différentes Bactéries. Le tableau ci-dessous montre jusqu'à quel point le milieu pourrait être utilisé pour la culture des microorganismes chromogènes.

· TABLEAU.

DÉSIGNATION DES BACTÉRIES	PROVENANCE des types étudiés	CULTURE en milieu synthétique type	
		Développement microbien	Fonction chromogène
<i>Chromogènes à pigment jaune</i>			
B. luteus, B. flavus	Eaux	—	—
4 types Bacillus (indéterminés).	Eaux	—	—
Micrococcus flavus liquefaciens	Eaux	—	—
3 types Micrococcus (indéterminés)	Eaux	—	—
<i>Chromogènes à pigment rouge ou rose</i>			
B. prodigiosus	Viande rôtie	++	—
B. rosaceus metalloïdes	Lab. M. Pr Macé	+	+
4 types Bacillus (indéterminés).	Eaux	++	+
Bacille rouge de Miquel	Inst. Pasteur (*)	++	—
<i>Chromogènes à pigment bleu, violet, vert</i>			
B. pyocyaneus	Eaux	—	+
B. pyocyaneus	Inst. Pasteur	—	+
B. pyocyaneus	Lab. Dr Thiry	++	+
B. pyocyaneus	Lab. Kral	++	+
B. violaceus.	Lab. M. Pr Macé	+	+

(*) Je remercie M. le Pr Macé et M. le Dr Legroux, chef du service des collections de l'Institut Pasteur, des belles cultures qu'ils ont bien voulu m'adresser.

(*) Je remercie M. le Pr Macé et M. le Dr Legroux, chef du service des collections de l'Institut Pasteur, des belles cultures qu'ils ont bien voulu m'adresser.

ACTION DE LA LUMIÈRE ET DE LA TEMPÉRATURE

Je viens d'étudier une des causes qui influencent la production des cristaux : le liquide de culture; il est d'autres agents qui ont une action sur la formation de la chlororaphine; parmi eux, je vais m'occuper d'abord de la température et de la lumière.

Température. — Les cultures effectuées à la température du laboratoire donnent un développement et une production de cristaux lents, mais elles sont tout indiquées pour la conservation de la vitalité de la Bactérie. La température la plus favorable à la formation de la chlororaphine est comprise entre 24° et 30° C. Vers 24°, les cristaux apparaissent plus lentement qu'à 30°, mais la végétation est de plus longue durée et le Bacille conserve aussi beaucoup plus longtemps sa propriété chromogène. Au-dessus de 30°, la production des cristaux diminue et disparaît généralement vers 35°-37°. Cependant, en ensemen-

çant avec une même culture un grand nombre de ballons, cent par exemple, il est bien rare qu'on n'en observe pas un qui offre des cristaux à 37°. Nous aurons, d'ailleurs, à revenir sur cette question.

A 40°, la Bactérie donne une culture faible et ne montre pas de cristaux. Les cellules microbiennes n'ont pas perdu, de ce fait, leur propriété chromogène, car, réensemencées à nouveau à la température de 25°, elles donnent des formes cristallines vertes.

Lumière. — Une étude complète de l'influence de la lumière sur la production de la chlororaphine aurait demandé, à elle seule, de longues expériences nécessitant un matériel spécial que je n'avais pas à ma disposition, ce qui fait que je n'ai pu étudier rigoureusement cette influence. Il semble, cependant, que la lumière diffuse est indifférente à la production de la chlororaphine.

INFLUENCE DE L'OXYGÈNE ET DE DIFFÉRENTS GAZ

Dans la première partie de cette étude, j'ai esquissé les besoins de la Bactérie en oxygène; je vais maintenant préciser l'action de ce gaz sur la végétation et la production de la chlororaphine. A cet effet, des ballons de 300 centimètres cubes de capacité reçoivent respectivement :

25, 50, 100, 150, 200, 250, 280 centimètres cubes de bouillon synthétique type. Ils sontensemencés avec des quantités proportionnelles d'une émulsion bactérienne, puis ils sont mis à l'étuve à 25° C. On constate que les ballons qui ont reçu 25 centimètres cubes de bouillon donnent presque autant de cristaux que ceux qui en ont reçu 50 centimètres cubes; ceux qui en contiennent 100 centimètres cubes ne donnent qu'une quantité de chlororaphine très peu supérieure à celle qui est fournie par les premiers. Puis, à mesure que la quantité de bouillon augmente, la production de chlororaphine diminue rapidement, et les

ballons qui sont remplis de liquide jusqu'à un centimètre de la bourre d'ouate donnent un rendement insignifiant en matière verte; à peine observe-t-on quelques rares cristaux dans toute la masse.

On arrive à des résultats identiques en remplaçant les ballons par des vases cylindriques. Dans ce cas, quelle que soit la quantité de liquide introduit dans le vase de culture, la surface exposée à l'air reste la même, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on utilise des ballons. Il résulte de ces essais qu'il doit exister un certain rapport entre la surface et la profondeur du liquide de culture. J'ai défini ce rapport en disant que la quantité de liquide doit être sensiblement le sixième de la capacité totale du ballon. Cette définition, quoique simplement approximative, est cependant suffisamment précise pour les cultures en ballons. Il semble que l'on puisse considérer dans la masse du liquide une couche supérieure, de faible épaisseur, où l'oxygène a facilement accès et où la Bactérie se développe activement. Puis, au-dessous de cette première zone, une seconde où l'oxygène ne peut accéder aisément et où le Bacille vit avec une extrême difficulté. Toute la masse alimentaire située au-dessous de la couche superficielle à végétation active, reste à peu près inutilisée.

En fait, elle est cependant un peu utilisée par suite de la diffusion des éléments au sein de la masse de culture. A mesure que le milieu s'appauvrit à la surface, il s'établit des courants allant de la profondeur vers la partie supérieure et amenant à la surface des éléments de la couche profonde, mais ces courants ne sont pas encore assez actifs pour assurer l'utilisation rationnelle des couches inférieures, c'est pourquoi il est nécessaire de ne donner à ces couches qu'une épaisseur aussi faible que possible.

Nous avons vu que la fonction chromogène s'atténue à mesure que l'on réduit la quantité d'air mise à la disposition de la Bactérie. On vérifie aisément cette assertion sur une même culture en y réalisant des points très différemment oxygénés. A cet effet, un saccharimètre du Dr Einhorn (ou tout autre appareil similaire) reçoit une quantité de bouillon telle que, la grande branche fermée étant remplie sans bulle gazeuse, le liquide

affleure environ à mi-hauteur de la boule. Après ensemencement, on constate un développement bactérien très intense avec formation de cristaux dans la partie comprise entre la surface du liquide aéré et la courbure de l'appareil, tandis que la branche fermée reste limpide ou louchit à peine.

D'autre part, si on empêche l'air de se renouveler dans les cultures en fermant hermétiquement les ballons immédiatement après l'ensemencement, la végétation se ralentit bientôt et s'arrête. La production des cristaux est faible ou nulle. Tous ces faits montrent l'action favorisante de l'oxygène sur la formation de la chlororaphine. L'étude de l'influence de ce gaz sera complétée par l'observation de cultures dans des atmosphères de plus en plus riches en oxygène.

Des ballons de 300 centimètres cubes sont scellés à la lampe : on soude au col deux tubulures dont l'une longue et recourbée sert d'abord à l'introduction du bouillon et à l'ensemencement et tient lieu ensuite de tube barométrique.

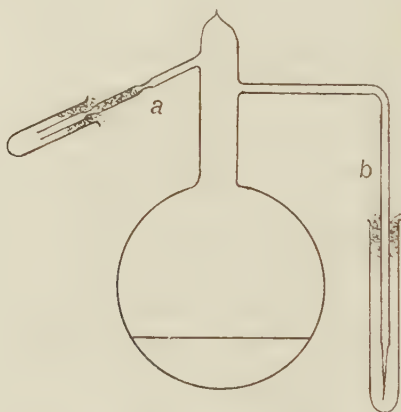


Fig. 1. — Ballon permettant d'effectuer les cultures dans des atmosphères artificielles limitées (Voir explications dans le texte).

La figure 1 représente un ballon à la sortie de l'autoclave. On brise l'extrémité effilée de la tubulure *b* et par légère aspiration en *a* on ensemence le ballon. Puis la tubulure *b* est scellée à nouveau et on fait en *a* successivement cinq fois le vide à

la trompe à eau et cinq rentrées d'un mélange gazeux d'O et N en proportions déterminées. Les atmosphères artificielles que j'ai utilisées avaient une richesse en O variant de 35 à 100 %. On ensemente parallèlement des ballons ordinaires de même contenance, mais bouchés seulement par un tampon d'ouate. Puis toutes les cultures sont mises à 25° C.

Le tableau ci-dessous résume les résultats observés sur des cultures faites en présence de quantités croissantes d'oxygène.

ATMOSPHÈRE O ET N oxygène pour cent en volume	DATE D'APPARITION des cristaux	OBSERVATIONS sur la production des cristaux	OBSERVATIONS sur la végétation
35	3 ^e jour		
45	—	supérieure	sensiblement
55	—	au témoin	plus forte
65	—	↓	que témoin
75	4 ^e jour	égale	↓ égale
80	6 ^e —	au témoin	↓ au témoin
85	8 ^e —	↓	↓
90	10 ^e —	inférieure	plus faible
100	10 ^e —	au témoin	que témoin
Témoin	7 ^e	↓	↓

Une atmosphère renfermant 35 à 65 % d'oxygène favorise la production des cristaux et détermine une végétation plus active, mais qui s'arrête plus tôt que dans les cultures témoins, ainsi qu'on pouvait le prévoir. Au-dessus de 65 % d'oxygène, l'apparition des cristaux est retardée; mais jusqu'à 80 %, leur précipitation s'effectue cependant encore plus hâtivement et aussi abondamment que dans le témoin et ce n'est qu'à partir de 85 % que l'oxygène influence défavorablement la production de chlororaphine.

Toutes les cultures effectuées dans des atmosphères renfermant plus de 35 % d'O présentent une coloration jaune plus ou moins foncé, alors que cette teinte s'observe très irrégulièrement en présence de l'air; les cultures ont une réaction alcaline, comme les témoins. Il est à remarquer que dans les atmosphères riches en oxygène le trouble bactérien, au lieu de débiter à la surface aérée du liquide, comme on l'observe dans les cultures

faites en présence de l'air, apparaît simultanément dans toute la masse. La cellule microbienne n'éprouve pas de modifications morphologiques sensibles du fait de la culture en présence de quantités croissantes d'oxygène; tout au plus observe-t-on des éléments plus allongés que la forme normale dans les ballons à 85, 90 et 100 %.

Si l'oxygène à dose convenable exerce une action favorisante, c'est qu'il doit être absorbé par la cellule bactérienne, ce qui sera indiqué par une ascension du mercure dans le tube barométrique.

L'examen du tableau suivant permet de se rendre compte de la marche de cette absorption pendant la durée de la culture.

ATMOSPHÈRES oxygène pour cent en volume	VALEUR DE L'ASCENSION EXPRIMÉE EN MILLIMÈTRES DE MERCURE							
	1 ^{er} jour	2 ^e jour	3 ^e jour	4 ^e jour	5 ^e jour	6 ^e jour	7 ^e jour	8 ^e jour
35	0	0	25 -	50	55	70	70	0
75	0	20	38	60 -	72	90	100	90
85	25	60	120	160	180	190	200	200 +

NOTA. — Les signes + indiquent l'apparition des cristaux.

On voit que la dépression augmente d'abord avec l'âge de la culture, puis passe par un maximum, et enfin diminue légèrement. A un moment donné, elle est d'autant plus grande que l'atmosphère est plus riche en oxygène, ce qui démontre l'avidité de la Bactérie pour ce gaz. Les cristaux n'apparaissent que lorsqu'un vide partiel s'est produit dans le ballon et que l'atmosphère a déjà subi un appauvrissement en oxygène. Cet appauvrissement est d'ailleurs beaucoup plus grand que celui qu'on pourrait déduire de l'observation du tube barométrique. En effet, l'analyse des gaz, effectuée à différents âges de la culture, montre qu'en même temps qu'il y a une absorption d'oxygène, il y a un dégagement plus ou moins grand de CO_2 . Je me bornerai à citer un seul exemple. Des ballons après ensemencement préalable sont remplis d'O pur suivant la technique donnée

plus haut; on scelle les tubulures et on met à l'étuve. On procède à l'analyse au bout de vingt jours. L'extraction des gaz n'étant pas faite à l'aide de la trompe à mercure, ce qui entraînerait des produits volatils du bouillon, tels que CO_2 , NH_3 , etc., mais en ouvrant les ballons sous le mercure; par suite du vide existant, le liquide pénètre dans le ballon. On détermine la quantité de métal qui a pénétré dans le vase de culture et on chasse les gaz restants, par le mercure.

L'analyse d'un type a donné les résultats suivants :

Capacité totale du ballon	305 ^{cm} 3
Vide (volume du Hg entré)	51,5
Volume total du gaz recueilli	200,5

Composition de l'atmosphère recueillie

	Pour cent en volume
Acide carbonique	87,8
Oxygène	0,0
Ammoniaque	12,2

En réalité, le chiffre 87,8 ne représente pas seulement l'acide carbonique, mais encore des traces de produits volatils acides provenant du bouillon.

Pour des raisons analogues, le chiffre obtenu pour l'ammoniaque est trop fort, mais il faut remarquer que ce n'est pas la composition quantitative de l'atmosphère qui nous intéresse le plus, mais bien sa composition qualitative.

La disparition complète de l'oxygène montre combien est grande l'avidité de la Bactérie pour ce gaz. Le dégagement considérable de CO_2 , NH_3 , etc. prouve que le tube barométrique n'accuse que la différence de pression entre l'oxygène absorbé et les produits volatils dégagés. Il serait donc illusoire de conclure des expériences précédentes que les cristaux verts peuvent se former dans une atmosphère renfermant par exemple 100 % d'oxygène. Lorsque les formes cristallines apparaissent dans le milieu, l'atmosphère de la culture est profondément modifiée. On peut essayer de tourner la difficulté en renouvelant cons-

tamment l'atmosphère, mais les résultats sont variables suivant la vitesse du courant gazeux ainsi qu'en témoigne l'exemple suivant.

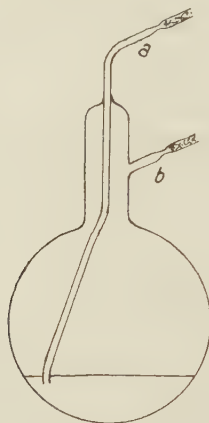


Fig. 2. — Ballon à cultures dans des atmosphères renouvelées (Voir explications dans le texte).

A des ballons de 600 centimètres cubes (fig. 2), on soude intérieurement un tube *a*, qui pénètre de quelques millimètres dans la couche de liquide nutritif, au voisinage de la paroi latérale du ballon; c'est par ce tube que s'effectue l'arrivée du gaz dans la culture. Un autre tube *b*, soudé à la partie supérieure du col, permet de faire l'aspiration.

Après ensemencement, on fait passer dans les ballons des courants gazeux de nature et de vitesse différentes. Avec l'air, lorsque la vitesse du courant est égale ou supérieure à deux bulles par seconde, on ne remarque pas de formations cristallines. En ne faisant passer qu'une bulle par seconde, on n'observe que quelques cristaux dans la partie de la culture la plus éloignée de l'arrivée de l'air. Le voile est brisé seulement au point où s'échappe la bulle gazeuse. Si on arrête le passage de l'air dans ces ballons au moment où apparaissent les premières formes cristallines, on constate une abondante précipitation, parfois très brusque, de chlororaphine.

Enfin des passages d'air plus lents qu'une bulle à la seconde, permettent la production régulière et abondante des cristaux.

Mais du fait que la présence d'une trop grande quantité d'oxygène peut retarder l'apparition des cristaux peut-on prétendre favoriser la production de la substance verte en faisant vivre la Bactérie, à partir d'un certain moment de sa végétation, dans une atmosphère de moins en moins oxygénée? Pour le vérifier, j'ai fait les expériences suivantes : après un, deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit jours d'ensemencement, des ballons sont fermés hermétiquement; d'autres reçoivent des atmosphères de gaz inertes en quantités variables; enfin dans d'autres ballons, on fait des vides correspondant à des hauteurs de mercure variables. Ces différents essais conduisent à des résultats qu'on peut résumer ainsi : la fermeture précoce (après un, deux, trois jours) entrave ou supprime la formation des cristaux, mais, lorsque les cultures ne sont fermées qu'au moment de l'apparition des premières formes cristallines, la production de substance verte ne semble guère modifiée.

L'appauvrissement précoce en oxygène, lorsqu'il est très faible, ne fait qu'entraver la formation des cristaux; s'il est assez sensible, il en empêche toute production. Enfin, des atmosphères de gaz inertes introduites au début de la précipitation des cristaux ne paraissent pas l'arrêter.

Le Bacille peut vivre dans des atmosphères moins oxygénées que l'air; peut-il se développer en l'absence rigoureuse d'oxygène? Des cultures faites soit dans le vide, soit en présence d'hydrogène, d'azote ou de CO_2 n'ont jamais présenté de traces de végétation bactérienne et, *a fortiori*, de cristaux. Pour pouvoir tirer de ces expériences des résultats précis, il est absolument indispensable d'expulser les dernières traces d'oxygène qui restent souvent en dissolution dans le liquide de culture.

On pourrait expliquer ces faits de la façon suivante : en présence d'oxygène, le Bacille donne naissance à une substance mère des cristaux, soluble et non cristallisable dans les cultures; puis, la Bactérie vit en anaérobie en l'absence d'oxygène, empruntant ce métalloïde à la substance mère qu'elle réduit ainsi et fait passer à l'état de chlororaphine extrêmement peu soluble et cristallisant même dans des solutions très étendues.

Nous verrons plus loin quelle valeur il convient d'accorder à cette hypothèse.

TRANSFORMATION DE L'ALIMENT ORGANIQUE DANS LE MILIEU SYNTHÉTIQUE TYPE

Pour se développer et former des cristaux, le Bacille doit consommer les éléments qui lui sont fournis par le milieu. Il est donc intéressant de suivre la marche de la disparition de ces éléments. Pour cela, on peut ensemençer le Microbe sur milieu synthétique (asparagine, glycérine, etc.), et, à différents âges de la culture, procéder aux opérations suivantes :

- 1^o Dosage de l'alcalinité par titrage en retour;
- 2^o Dosage de l'ammoniaque par distillation dans le vide en présence de magnésie;
- 3^o Dosage de l'ammoniaque après hydrolyse, en hydrolysant l'asparagine par l'acide chlorhydrique à l'ébullition, et dosant ensuite l'ammoniaque comme il est indiqué plus haut;
- 4^o Dosage de l'azote total en utilisant la méthode de KJELDAHL modifiée par MAQUENNE (1899);
- 5^o Dosage de la glycérine. Ce dosage est effectué par la méthode de PASTEUR, mais toutes les évaporations sont faites dans le vide et à la température du laboratoire.

J'ai réuni dans le tableau suivant les résultats obtenus dans trois cultures; I et II ont donné une production normale de cristaux, tandis que III a présenté une formation tardive et peu abondante de chlororaphine. Tous les résultats ont été ramenés à 100 centimètres cubes de bouillon.

Dans les cultures *A* et *B* la Bactérie alcalinise le milieu et détermine une hydrolyse de l'asparagine. La culture *C* où le Bacille transforme toute l'asparagine en sels ammoniacaux doit être considérée comme un cas particulier. Un seul fait est constant dans les trois cultures : c'est la disparition de l'élément azoté et carboné à l'apparition des cristaux.

TABLEAU.

MILIEUX ANALYSÉS	ALCALINITÉ EN H^2SO_4	NH_3 AVANT HYDROLYSE exprimé en N	NH_3 APRÈS HYDROLYSE exprimé en N	AZOTE TOTAL N	ASPARAGINE	GLYCÉRINE	APPARITION des cristaux
	grammes	grammes	grammes	grammes	grammes		
I { Culture A	Témoin :	0,0245	0,0040	0,0630	0,1400	0,7285	3,23
	2 ^e jour . .	0,0356	0,0434	0,0714	0,1323	0,4762	1,99
	5 ^e jour . .	0,0539	0,0630	0,0889	0,1309	0,3637	1,62
	15 ^e jour . .	0,0882	0,0679	0,0896	0,1260	0,3110	1,66
La production des cristaux est sensiblement terminée le 7 ^e jour							
II {	Témoin :	0,0000	0,0022	0,0560	0,1302	0,6856	2,41
	Culture B : 10 ^e jour.	0,0612	0,0609	0,0700	0,1057	0,2390	1,05
Cristaux très abondants.							
III { Culture C	Témoin :	0,0000	0,0056	0,0644	0,1295	0,6637	1,68
	2 ^e jour . .	0,0049	0,0189	0,0630	0,1274	0,5812	1,11
	4 ^e jour . .	0,0490	0,0812	0,0854	0,1204	0,2099	0,81
	14 ^e jour . .	0,0735	0,1164	0,1164	0,1170	»	»
REMARQUE. — Les cristaux n'apparaissent que le 16 ^e jour dans la culture C.							

Acides volatils. — Nous venons de voir que l'asparagine et la glycérine fermentent. Nous étudierons d'abord les produits de fermentation volatils et, parmi eux, les corps à fonction acide seront envisagés les premiers.

A cet effet, le milieu de culture est soumis à la distillation fractionnée de Duclaux. Les résultats analytiques permettent le tracé d'une courbe indiquant le mélange d'un acide supérieur à l'acide propionique avec de l'acide acétique ou formique. Mais la quantité d'acides volatils produits durant la fermentation est extrêmement petite. Ainsi 100 centimètres cubes de distillat total offrent une acidité qui, exprimée en H_2SO_4 , varie de 0^{gr},0060 à 0^{gr},0180. De plus l'acide volatil homologue inférieur de l'acide propionique est en proportion très faible par rapport à son homologue supérieur; il en résulte qu'une diagnose rigoureuse des acides volatils est impossible.

Produits volatils neutres (alcools, aldéhydes, cétones). — 500 centimètres cubes de culture sont soumis à la distillation,

on recueille 250 centimètres cubes de distillat. Le liquide distillé est alcalin et son alcalinité est due à la présence d'ammoniaque. On neutralise le distillat par l'acide phosphorique et on distille à nouveau, de façon à recueillir environ 125 centimètres cubes de liquide.

Le produit ainsi obtenu a une odeur pénétrante. La recherche des alcools, aldéhydes, cétones, effectuée sur le distillat, suivant la technique indiquée par GRIMBERT (1903), a été négative.

Produits volatils basiques. — Pour la recherche des produits volatils basiques, 500 centimètres cubes de culture sont additionnés de magnésie et soumis à la distillation. Le liquide distillé ne paraît pas renfermer d'amines. Par contre, l'ammoniaque est un produit absolument constant de la fermentation.

Corps odorant. — Il est à remarquer que, lorsqu'on distille une culture, qu'elle soit préalablement acidifiée, neutralisée ou alcalinisée, le distillat présente toujours une odeur pénétrante, odeur qui est en partie masquée par celle de l'ammoniaque dans le cas de distillation alcaline, mais qui réapparaît par simple neutralisation du liquide distillé. Le corps odorant, entraînable par la vapeur d'eau, semble passer en quantités égales au commencement et à la fin de la distillation, d'où la difficulté d'enrichir le distillat en principe aromatique. Je n'ai pas davantage pu l'extraire du milieu de culture par agitation avec l'éther, le chloroforme, etc...

Produits phénoliques. — Pour mettre en évidence les produits phénoliques, 500 centimètres cubes de milieu sont additionnés, soit de 25 grammes de H_2SO_4 (KOSSLER et PENNY), soit de 10 grammes de HCl (LEWANDOWSKI), et distillés. Le distillat étant neutralisé par la soude, on recherche les phénols à l'aide des réactifs spéciaux. Il résulte des données analytiques qu'il est impossible de conclure à la présence de phénols, même à l'état de traces. D'autre part, la fermentation ne fournit pas d'indol; or, DOBRWOTSKI (1910) fait remarquer à ce sujet qu'il

ne lui « est pas arrivé une seule fois de découvrir les phénols dans les cultures de Bactéries qui ne produisent pas d'indol ».

Après avoir étudié les produits volatils de la fermentation, il reste à envisager la production des composés fixes. La recherche des acides aspartique, succinique et lactique a été négative.

RÉSUMÉ

En résumé *B. chlororaphis* ensemencé sur milieu synthétique type hydrolyse partiellement l'asparagine, mais la réaction peut être plus énergique et arriver à transformer tout l'acide amido-aminé en sels ammoniacaux. On constate en outre la présence d'acides volatils organiques, de CO_2 et d'un corps odorant. L'apparition des cristaux correspond à une disparition de l'élément azoté et carboné.

MILIEUX DE SUBSTITUTION — TRANSFORMATION DE L'ALIMENT AZOTÉ ET CARBONÉ

Aliment azoté. — L'étude du milieu synthétique type nous a montré que l'asparagine pouvait être remplacée par le glycocolle, l'urée, l'acide aspartique, le succinate d'ammoniaque.

Nous allons passer rapidement en revue les caractères saillants par lesquels les cultures effectuées en ces divers milieux diffèrent de celles en bouillon type.

Glycocolle. — Le glycocolle peut être substitué à l'asparagine, mais à la condition de porter la quantité de phosphate de potasse à la dose de 200 milligrammes. Les cultures ne sont jamais fluorescentes et la production des cristaux est un peu plus faible qu'avec l'asparagine.

Urée. — La substitution précédente a exigé une légère modification du milieu, celle-ci demande certaines précautions. En effet, la stérilisation du milieu par la chaleur, le seul mode d'ailleurs que l'on puisse utiliser sous peine d'introduire des éléments étrangers, amène toujours une légère hydrolyse de l'urée et for-

mation de carbonate d'ammoniaque. Or, nous verrons que *B. chlororaphis* est très sensible à l'ammoniaque, d'où la nécessité de neutraliser le milieu après stérilisation. A la dose de 400 milligrammes, l'urée permet un développement bactérien un peu plus faible que l'asparagine. La production des cristaux est normale et généralement on n'observe pas de fluorescence.

Le dosage de l'urée par l'hypobromite de soude et en suivant la technique indiquée par MIQUEL (1889-1890) permet de se rendre compte de la marche de la fermentation. C'est ce que nous voyons dans le tableau ci-dessous où tous les résultats sont ramenés à 100 centimètres cubes :

MILIEUX ANALYSÉS	URÉE	GLYCÉRINE	OBSERVATIONS
	grammes		
Témoin	0,4051	1,61	
<i>Culture A</i>			
2 ^e jour.	0,3874	1,50	
4 ^e jour.	0,3575	1,31	
6 ^e jour.	0,1989	1,28	
7 ^e jour.	0,0795	1,23	Apparition des cristaux.

L'urée disparaît donc assez rapidement sous l'action de la Bactérie. Elle donne naissance à du carbonate d'ammoniaque que l'on met aisément en évidence dans la culture.

Acide aspartique. — L'acide aspartique donne des cultures présentant une faible fluorescence au début et montrant ensuite des cristaux.

Succinate d'ammoniaque. — Sur milieu renfermant 1 % de succinate d'ammoniaque, le Bacille donne des cultures fréquemment colorées en jaune, mais différant peu par leurs autres caractères des cultures sur milieu type.

La marche de la fermentation dans le milieu à base de succinate est indiquée dans le tableau suivant :

TABLEAU

MILIEUX analysés	RÉACTION du milieu exprimée en $H^+ SO_4$	AMMO- NIAQUE	GLYCÉ- RINE	OBSERVATIONS	RÉDUCTION de la culture filtrée par Zn et HCl
Témoin. . .	Acidité 0,0343	0,1938	1,75		Pas de coloration.
<i>Culture A</i>					
2 ^e jour. . . .	0,0245	0,1860	1,68		— —
3 ^e —	0,0099	0,1722	1,63		— —
4 ^e —	Alcalinité 0,0245	0,1640	1,57		Teinte verdâtre.
6 ^e —	0,0490	0,1462	0,65	Quelques cristaux.	Magnifique teinte verte.
7 ^e —	0,0550	0,1401	0,58	Cristaux abondants.	— —

La formation des cristaux correspond donc à un appauvrissement du milieu en ammoniacque et en glycérine. Mais il y a plus; par réduction de la culture filtrée, au moyen du Zn et de l'HCl, on peut mettre en évidence des traces d'une substance qui colore le milieu en vert. Pour des raisons que nous verrons plus loin, ce corps peut être considéré comme la substance mère des cristaux verts. Or, l'apparition de ce corps soluble au sein de la culture correspond à une chute brusque de la glycérine et de l'asparagine. Mais l'action est surtout sensible sur la glycérine. En effet, tandis que la Bactérie du premier au quatrième jour n'a consommé que 18 centigrammes de glycérine, du quatrième au sixième jour, époque qui correspond à l'édification de la substance mère, la consommation atteint 98 centigrammes.

Aliment hydrocarboné. — Jusqu'ici, nous ne nous sommes occupé que de l'aliment azoté; nous allons maintenant examiner rapidement l'aliment hydrocarboné. Nous savons déjà que la glycérine peut être remplacée par différents alcools ou sucres et que l'apparition des cristaux correspond à une forte consommation de l'aliment hydrocarboné. Nous nous bornerons à vérifier ces deux faits dans quelques milieux, car l'étude complète de tous les alcools ou sucres essayés au cours de ce travail nous entraînerait trop loin.

Mannite. — En présence de mannite, le Bacille donne des cultures jaunes et à cristaux verts. L'hexol est consommé sans être au préalable transformé, par oxydation, en aldose correspondant.

Ce fait est intéressant à noter, car il concorde avec les caractères réducteurs des diverses cultures de *B. chlororaphis*.

Glucose. — Les milieux glucosés permettent une production de cristaux un peu inférieure à celle des bouillons glycélinés. Afin de vérifier la consommation des sucres, j'ai, pour tous les sucres en général, et pour le glucose en particulier, procédé aux opérations suivantes :

1^o Défécation du milieu par le nitrate mercurique selon la technique de PATEIN (1902).

2^o Dosage du sucre, par pesée du cuivre réduit dans la liqueur de Fehling.

Pour le dextrose, je me suis conformé rigoureusement aux indications données par SOXHLET. Le tableau ci-dessous indique la consommation du glucose dans trois cultures différentes et dans lesquelles les cristaux commencent à se former.

	Témoin A	Témoin B	Témoin C
Glucose, pour cent.	2 ^{gr} ,460	1 ^{gr} ,987	1 ^{gr} ,050
	Culture A	Culture B	Culture C
Glucose, pour cent .	1 ^{gr} ,218	0 ^{gr} ,625	0 ^{gr} ,214

La production de la matière verte coïncide avec une forte consommation de glucose.

Lévulose. — Le lévulose se comporte sensiblement comme le glucose dans la production de la chlororaphine.

Mannose et galactose. — Ces deux hexoses seront étudiés à la fin des sucres en raison de leurs propriétés particulières dans les milieux synthétiques.

Saccharose. — *Bacillus chlororaphis* dans les milieux saccharosés donne des cultures jaunes avec formation de cristaux.

Pour étudier les transformations déterminées par la Bactérie dans ce milieu, j'ai procédé au dosage du saccharose et de l'asparagine.

Le saccharose est dosé par la liqueur de Fehling après inversion. L'interversion est effectuée suivant les prescriptions de

NICOL. Le tableau ci-dessous, où tous les résultats sont ramenés à 100, montre la marche de la fermentation.

MILIEUX ANALYSÉS	ALCALINITÉ EN H^2SO_4	NH^3 AVANT HYDROLYSE exprimé en N	NH^3 APRÈS HYDROLYSE exprimé en N	N TOTAL	ASPARAGINE	SUCRE RÉDUCTEUR avant inversion	SUCRE RÉDUCTEUR après inversion	SACCHAROSE non attaqué
	grammes	grammes	grammes	grammes	grammes	grammes	grammes	grammes
Témoin	0,0005	0,0021	0,0560	0,1295	0,6803	0,000	1,805	»
Culture de 9 jours.	0,0395	0,0658	0,0791	0,1239	0,3112	0,915	0,983	0,064

NOTA. — Au 9^e jour la culture présente de nombreux cristaux.

Le saccharose est donc interverti et rapidement consommé. L'hydrolyse de l'asparagine est du même ordre que celle que la Bactérie détermine dans les milieux glycélinés.

Maltose, Lactose. — S'il est possible d'obtenir des cristaux en milieux saccharosés, la production de la chlororaphine ne peut s'effectuer en milieux lactosés ou maltosés. Les analyses montrent que le lactose et le maltose sont sensiblement respectés dans les cultures.

Mannose et Galactose. — Parmi les substances hydrocarbonées, nous venons de voir que les unes fermentent activement et permettent la formation des cristaux, tandis que d'autres sont respectées presque intégralement et ne permettent pas la production de la substance verte. Nous allons examiner maintenant comment se comportent le *d*-mannose et le *d*-galactose.

B. chlororaphis ensemencé sur milieux mannosés donne des cultures ne présentant que quelques cristaux, mais la réduction de la culture filtrée par Zn et HCl fait apparaître une teinte verte, intense. L'analyse montre que cet hexose est peu attaqué ainsi que l'attestent les chiffres suivants :

	Mannose pour 100
Témoin	18,994
Culture de neuf jours	1,410

Avec le galactose, on n'observe plus la production de cristaux. Seule, la réduction de la culture filtrée décèle des traces de substance mère. Ce sucre est encore moins attaqué que le mannose ainsi qu'il ressort des résultats suivants :

	Galactose pour 100
Témoin	1 ^{er} ,982
Culture de neuf jours	1 ,755

Avant de conclure, je ferai remarquer que je suis autorisé à comparer l'action des différents alcools ou sucres, car je ne mets en parallèle que des culturesensemencées avec une même semence. Des semences diverses peuvent, en effet, avoir des actions différentes, notamment sur le galactose, ainsi que nous le verrons plus loin.

Il résulte de ces essais de substitution d'aliments hydrocarbonés, que la production des cristaux ne peut avoir lieu que lorsque le milieu renferme un sucre ou un alcool susceptibles de fermenter énergiquement. S'il est peu attaqué (cas du mannose), la substance mère peut s'organiser, mais la précipitation des cristaux est faible; si l'attaque du sucre est encore moindre (cas du galactose), la production de la substance mère est presque nulle et les cristaux ne peuvent se former. Enfin, si le sucre ou l'alcool (ex. : lactose) est complètement respecté, il n'y a plus formation de substance mère.

RÉACTION DU MILIEU A L'APPARITION DES CRISTAUX

Les observations faites sur les transformations des éléments du milieu ont montré que la culture était alcaline lors de la précipitation des cristaux.

Afin de vérifier si ce fait est constant, j'ai déterminé la réaction d'un certain nombre de cultures : 1^o en milieu synthétique type; 2^o en milieux divers. Dans le premier cas, je n'ai dosé l'alcalinité que dans des cultures différant du type normal, soit

par une précipitation plus tardive des cristaux, soit par un développement bactérien moindre; l'étude du milieu synthétique type nous ayant renseigné sur la réaction des cultures normales.

Les résultats des différents dosages ramenés à 100 centimètres cubes de bouillon sont consignés dans les tableaux suivants :

DÉSIGNATION DES CULTURES,	AGE DE LA CULTURE	ALCALINITÉ EN H^2SO^4
		grammes
Milieu asparagine, glycérine, etc...		
A.	5 jours	0,1225
B.	6 —	0,1176
C.	7 —	0,0530
D.	7 —	0,0490
E.	10 —	0,0612
F.	11 —	0,0735
Milieu succinate, glycérine, etc...		
A.	5 jours	0,0490
B.	8 —	0,0490
C.	10 —	0,0735
D.	10 —	0,0245
Milieu urée, glycérine, etc...		
A.	7 jours	0,0735
B.	8 —	0,0682

Milieu asparagine et aliment hydrocarboné variable

DÉSIGNATION DES CULTURES	RÉACTION A L'APPARITION DES CRISTAUX
Milieu glyciné	Alcalinité en H^2SO^4 0,0172
— mannité	— — 0,0147
— lévulosé	— — 0,0147
— saccharosé	— — 0,0147
— glucosé	Acidité en H^2SO^4 0,0140

On peut conclure de ces résultats que *les cristaux se précipitent toujours en milieu alcalin*, sauf dans le cas des cultures en bouillon glucosé, où la réaction est très faiblement acide.

La formation des cristaux peut aussi s'effectuer en milieu synthétique type additionné d'acide sulfurique, phosphorique, succinique, avec une acidité voisine de 0^{gr}.0098 % pour H₂ SO₄ et PO₄ H₃, mais de beaucoup supérieure pour l'acide succinique.

INFLUENCE DES BASES ET DES PRODUITS DE DIVERSES FERMENTATIONS DE L'ASPARAGINE

Action de l'ammoniaque. — L'analyse montre que, lorsque la végétation s'arrête, le milieu n'est pas complètement épuisé en éléments nutritifs. Le Bacille a donc dû former des *produits microbiens* qui, jouant le rôle d'antiseptiques, ont arrêté son développement. Parmi les produits de la fermentation, l'ammoniaque mérite de fixer l'attention par sa constance: il est donc, par suite, intéressant de rechercher son action sur la production des cristaux et sur la végétation bactérienne. A cet effet, des cultures effectuées en milieu synthétique type reçoivent des doses croissantes d'ammoniaque. Le tableau ci-dessous indique les modifications morphologiques et physiologiques déterminées par l'alcali.

I

DÉSIGNATION des cultures	NH ³ ADDITIONNÉ à 100cm ³ de bouillon	
	grammes	
A	0,0085	Bacilles mobiles, longueur un peu supérieure à la moyenne.
B	0,0170	La taille des cellules augmente
C	0,0250	avec les doses croissantes de
D	0,0340	NH ₃ . Les cultures offrent de
E	0,0420	longs bacilles souvent réunis
F	0,0510	en filaments. La motilité au con-
G	0,0680	traire diminue de A à G où les
		cellules sont très souvent immo-
H	0,0850	biles.
		Pas de voile, ni fluorescence, ni cristaux.
		Pas de développement.

Les résultats précédents montrent que l'ammoniaque, à

doses relativement faibles, entrave le développement bactérien, détermine l'allongement des bacilles (Voir planche, fig. 6), diminue ou supprime la motilité et s'oppose à la production des cristaux, et qu'à doses plus fortes, elle arrête toute manifestation vitale. Il y a lieu, toutefois, de remarquer que les chiffres indiqués dans le tableau ci-dessus ne sauraient être considérés avec leur valeur absolue, car l'alcalinité de la culture ne reste pas constante et égale à celle qui serait déterminée par l'addition de l'ammoniaque. La base produit, en effet, un précipité dans le milieu, et une certaine quantité de gaz NH_3 est perdue par volatilisation. L'examen de la culture G, par exemple, montre une alcalinité qui, exprimée en NH_3 , est de $0^{\text{gr}},0400$ alors qu'on a ajouté initialement au milieu $0^{\text{gr}},0680$ d'alcali. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce fait lorsque nous rechercherons les causes déterminant les modifications morphologiques de la cellule bactérienne.

Dans toutes les cultures ammoniacales, une modification curieuse vient s'ajouter à celles que j'ai signalées dans le tableau ci-dessus; c'est l'apparition d'une substance chromogène bleue.

Cette nouvelle coloration de la culture s'obtient très aisément en partant d'un milieu synthétique additionné de 25 milligrammes de NH_3 pour 100 de bouillon. Après un séjour de dix à quinze jours à 25° , les cultures sont abandonnées à la température de la chambre et, au bout de vingt, trente jours, parfois plus, le bleuissement peut être observé. Cette coloration ne se manifeste que sur les cultures en tubes où elle envahit environ les quatre cinquièmes du liquide, la partie supérieure du bouillon étant colorée en jaune. En ballon (1 centimètre cube de bouillon pour 6 centimètres cubes de capacité totale du vase) toute la culture présente une teinte jaune semblable à celle de la partie supérieure des tubes et ne bleuit jamais. La substance bleue est insoluble dans l'alcool amylique, l'éther et le chloroforme; l'agitation et les réactifs oxydants jaunissent instantanément les cultures où elle a pu se former. Ce fait permet de comprendre pourquoi la partie supérieure du tube et les ballons de culture où l'air a facilement accès, ne présentent pas le chromogène

bleu, mais le jaune. D'ailleurs, dans les tubes, le bleuissement commence toujours à la partie inférieure et gagne peu à peu les couches supérieures en teinte dégradée pour passer au jaune à la surface du liquide. Les alcalis, les acides décolorent les cultures bleuies, mais l'action des acides se continue après la décoloration, et on voit apparaître, au bout de quelques heures, une teinte rose très vive. Cette coloration rose se produit même instantanément si, après addition d'acide sulfurique, par exemple, on agite énergiquement le tube et qu'on le chauffe légèrement.

En résumé, l'ammoniaque détermine l'apparition d'une fonction chromogène nouvelle, et il semble même que la Bactérie qui, jusqu'alors était toujours incolore, soit faiblement colorée en bleu très pâle lorsqu'elle se développe dans un milieu renfermant cet alcali, mais c'est là un point que je ne puis préciser.

Action de la potasse et de la soude. — L'ammoniaque agit-elle en tant que base et alors peut-on la remplacer par un autre composé basique, ou jouit-elle d'une action propre? Pour répondre à cette question, il suffit d'observer les cultures faites en un milieu auquel on ajoute des doses croissantes de soude et de potasse.

Le tableau ci-dessous se rapporte à l'action de la soude.

II

DÉSIGNATION des cultures	NaOH ADDITIONNÉE à 100cm ³ de bouillon	MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES	CARACTÈRES DE CULTURE
A	grammes 0,0333	Forme normale.	Développement moyen ; cristaux vers 20 ^e jour.
B	0,0666	— — —	Développement moyen ; cristaux vers 20 ^e jour.
C	0,0990	} La taille des cellules augmente légèrement pour arriver à donner en G des formes qui peuvent at- teindre deux à deux fois et demie la longueur des cellules normales.	Pas de voile, ni fluores- cence, ni cristaux, teinte bleue extrêmement faible
D	0,1332		
E	0,1665		
F	0,1998		
G	0,2664		
H	0,3330		

Je ferai ici une remarque analogue à celle que j'ai faite pour NH_3 . L'addition de l'hydrate de sodium au milieu détermine un précipité, et l'alcalinité de la culture ne correspond plus à la quantité de base ajoutée. Ainsi les ballons (G et H), après quatre jours d'ensemencement, accusent respectivement une alcalinité de $0^{\text{gr}},1440$ en NaOH au lieu de $0^{\text{gr}},2664$; et $0^{\text{gr}},1160$ au lieu de $0^{\text{gr}},333$.

Les chiffres du tableau ne sauraient donc être considérés avec leur valeur absolue, mais comme représentant simplement des doses croissantes de soude ajoutées au milieu.

Ces réserves étant faites, il ressort néanmoins de la comparaison des tableaux *I* et *II* que l'action de la soude est comparable à celle de l'ammoniaque, tout en étant notablement plus faible. Ce fait s'explique aisément. En effet, la soude, même en quantités aussi faibles que celles indiquées au tableau ci-dessus, détermine à la température du laboratoire une faible hydrolyse de l'asparagine avec mise en liberté de NH_3 . Il est donc logique d'admettre que l'hydrate de sodium additionné à la culture agit pour la plus grande partie comme producteur de NH_3 .

Il semble résulter de là que l'ammoniaque a une action spécifique. MIQUEL (1883), KITASATO (1888), BOER (1890), ont d'ailleurs montré le caractère antiseptique de cette base vis-à-vis de certaines bactéries. Mais, comme nous avons constaté la présence de NH_3 dans les produits de fermentation de *B. chlororaphis*, on ne s'expliquerait guère la végétation normale de la Bactérie en milieu synthétique si on n'observait la formation de carbonate d'ammoniaque, sel faiblement antiseptique.

Si la présence de NH_3 a été constatée parmi les produits de la fermentation des cultures de *B. chlororaphis*, nous n'avons pas, par contre, décelé d'acide aspartique, alors que ARNAUD et CHARRIN (1891) ont montré que *B. pyocyaneus* hydrolyse l'asparagine en donnant de l'aspartate d'ammoniaque. J'ai cru intéressant, néanmoins, d'essayer l'action de l'acide aspartique et de NH_3 sur *B. chlororaphis*. Pour cela, j'ai ensemencé la Bactérie dans un milieu renfermant pour 100 : acide aspartique $1^{\text{gr}},400$; NH_3 25 milligrammes et, en outre, les éléments minéraux et

hydrocarboné du milieu synthétique type. Le Bacille donne des cultures brunes à développement très faible sans voile ni cristaux et l'examen microscopique montre des formes filamenteuses.

NEUBERG et CAPPEZZUOLI (1909) ont montré que certaines bactéries transforment l'asparagine en acide propionique et succinique. J'ai cru devoir étudier l'action de ces acides sur *B. chlororaphis* et, à cet effet, j'ai additionné le milieu synthétique type de 0^{gr},050 de propionate de sodium et 0^{gr},100 de succinate d'ammoniaque. Ensemencée sur le milieu ainsi obtenu, la Bactérie donne des cultures à développement microbien extrêmement faible, sans voile ni cristaux. L'examen microscopique montre des éléments à formes irrégulières.

INFLUENCE DES ACIDES

Nous savons que les cultures s'alcalinisent à mesure que la végétation se poursuit, et qu'une certaine alcalinité s'oppose au développement microbien. Nous allons maintenant rechercher les doses d'acidité compatibles avec la vie de la cellule et les manifestations de la fonction chromogène. Le tableau ci-dessous montre l'influence de doses croissantes d'acide sulfurique additionnées au milieu synthétique type.

DÉSIGNATION DES CULTURES	H ² SO ⁴ ADDITIONNÉ à 10 cm ³ de bouillon	RÉACTION à l'apparition des cristaux exprimée en H ² SO ⁴	DÉVELOPPEMENT	FLUORESCENCE	CRISTAUX	MODIFICATIONS morphologiques
	grammes	grammes				
A	0,0245	Alcalinité : 0,0245	abondant	éphémère	abondants	Bacilles courts mobiles.
B	0,0490	— 0,0098	assez abondant	éphémère	abondants	
C	0,0735	Acidité : 0,0098	faible	o	peu nombreux	Raccourcissement des cellules à mesure que l'acidité croît dans le bouillon.
D	0,0980	»	très faible	o	o	
E	0,1225	»	louchissement	o	o	
F	0,1470	»	louche faible	o	o	
G	0,1960	»	nul	o	o	»

Dans le tableau ci-dessus, je n'ai cité que quelques-unes des doses d'acide essayées; j'ai négligé tous les chiffres intermédiaires qui correspondaient à des actions que l'on peut ramener à celles du chiffre le plus voisin.

Il ressort de l'examen de ce tableau que des doses faibles d'acide minéral retardent l'apparition des cristaux, mais sans en supprimer la formation.

Les doses plus élevées empêchent la production de la chlorophane et peuvent arrêter le développement bactérien. Lorsque l'acidité est compatible avec la végétation, elle détermine un raccourcissement de la cellule.

L'action de l'acide phosphorique est comparable à celle de l'acide sulfurique.

Enfin l'acide succinique aux doses faibles ne paraît pas influencer la production des cristaux.

Causes déterminant l'apparition d'une forme définie dans un milieu donné. — Nous avons observé d'assez nombreuses variations morphologiques sous l'influence de divers agents chimiques, bases, acides, etc., dans les cultures de *B. chlororaphis*. Mais aucune n'est fixée. Une culture anormale quelconque, réensemencée dans des conditions favorables, acquiert bientôt les propriétés caractéristiques des cultures normales. Ces variations de caractères paraissent donc avoir la valeur de ce que l'on appelle aujourd'hui *fluctuation*.

Peut-on espérer déduire de l'étude que nous venons de faire les causes déterminant l'apparition d'une forme définie dans un milieu donné? A ce sujet, nous avons deux faits d'ordre général; *les bases produisent un allongement de la cellule et les acides déterminent un raccourcissement*.

Mais l'action des bases, et de l'ammoniaque en particulier, n'est pas toujours facile à mettre en évidence lorsqu'il s'agit de milieux contenant de l'acide aspartique. On sait que cet acide aminé, lorsqu'il n'est pas accompagné de NH_3 , permet l'obtention de cristaux.

Or, en présence de NH_3 , la production des formes cristallines

est supprimée et les cellules s'allongent considérablement quoique l'ammoniaque soit en faible quantité. Deux hypothèses peuvent être émises pour l'interprétation de ce phénomène : 1^o l'acide aspartique joue le rôle de *produit microbien* en présence d'ammoniaque, et son action propre s'ajoute à celle de la base, l'acide aminé redevient alimentaire en l'absence d'alcali; 2^o l'action de l'ammoniaque est augmentée du fait qu'elle agit en présence d'un aliment moins assimilable que l'asparagine. Quelle que soit la valeur de ces hypothèses, il reste acquis que l'acide aspartique, en présence de faibles quantités d'ammoniaque, provoque l'apparition de formes filamenteuses et le brunissement des cultures, et que le succinate d'ammoniaque et le propionate de sodium déterminent des formes nouvelles d'évolution.

INFLUENCE DE LA SEMENCE

Parmi les causes qui influent sur la production de la chlororaphine, nous avons négligé jusqu'à présent un facteur important : c'est le Bacille lui-même. Sans aller, ainsi que E. DUCLAUX (1898), jusqu'à considérer l'organisme vivant comme étant « *en état de mutation continue* », il faut cependant reconnaître qu'il est soumis à toutes les influences du milieu où il vit, milieu qu'il transforme incessamment pendant toute la durée de son existence, et que ces transformations peuvent, inversement, déterminer des variations de la cellule microbienne et de ses propriétés.

Nous sommes ainsi amené à étudier les modifications apportées à la production de la chlororaphine du fait de la qualité de la semence.

Lorsqu'on enseme des ballons renfermant le milieu synthétique type avec des cultures de deux à trois jours, on obtient de nombreux cristaux. Au contraire, les germes provenant de vieilles cultures ne produisent qu'une très faible quantité de chlororaphine.

On peut admettre, pour l'interprétation de ce fait, que, sous l'influence du milieu devenu de plus en plus antiseptique par

suite de la végétation, la fonction chromogène du Bacille a diminué. Il faut remarquer, toutefois, que cet affaiblissement ne porte pas sur toutes les cellules de la culture.

En effet, si on ensemence avec une culture âgée une série de plaques (gélose asparagine), on obtient, au bout de deux à trois jours, des colonies nombreuses qui, transportées en entier sur bouillon synthétique, donnent des résultats très différents; alors que certains ballons offrent une assez belle production de chlororaphine, d'autres ne montrent que quelques cristaux verts, et enfin un certain nombre en sont totalement dépourvus. Or, même en admettant que chacune des colonies obtenues sur gélose, a pour origine plus d'un germe primitif, il résulte de cette expérience que toutes les cellules d'une culture âgée ne sont pas également aptes à la production de la substance chromogène.

On ne peut cependant pas affirmer que toutes les cellules des cultures achromogènes ont perdu la faculté de donner de la chlororaphine. En effet, si on soumet une de ces cultures dépourvues de cristaux à des séries de passages successifs sur bouillon synthétique et sur plaque de gélose asparagine, il est toujours possible d'isoler des colonies chromogènes; je dirai même que jamais je n'ai observé de cultures qui, soumises à ces séries de passages, n'aient pas donné au moins quelques colonies à cristaux.

L'âge de la culture dans laquelle on prélève la semence influe donc sur la production de la chlororaphine. Mais, à côté de ce premier facteur, nous devons en signaler un second que DUCLAUX (1898) et GRIMBERT (1893) ont appelé l'*«éducation de la semence»*. Le milieu de culture dans lequel la semence est prélevée a, en effet, une très grande importance.

Cultivé en bouillon peptoné, le Bacille donne une faible production de chlororaphine; reporté en milieu synthétique, cette production, bien qu'étant de beaucoup supérieure, n'en reste pas moins assez peu importante. Au contraire, les pommes de terre, la gélose asparagine permettent l'obtention d'abondants cristaux verts et les semences prélevées dans ces cultures donnent en bouillon synthétique une formation abondante de chlororaphine. Mais il y a plus; lorsqu'on soumet des cultures à cristaux

abondants à des passages successifs sur plaques de gélose asparagine et bouillon chimiquement défini, on arrive à obtenir des colonies qui, ensemencées dans des conditions convenables, donnent une quantité de cristaux de beaucoup supérieure à celle du type moyen.

J'ai ainsi isolé une semence produisant environ 35 milligrammes de chlororaphine par litre de bouillon, alors que la majorité des races n'en donnent au maximum que 15 à 20 milligrammes. (A titre d'indication, j'ajouterai que la production des cristaux en milieu peptoné ne dépasse pas quelques milligrammes par litre.)

Le type à haute production cristalline ainsi obtenu ne conserve cette faculté que pendant un certain temps. Peu à peu, l'intensité de la fonction chromogène diminue et retombe à celle du type moyen. On peut, par des passages convenables, non seulement arriver à augmenter le poids de chlororaphine produite, mais encore hâter son apparition dans les milieux. C'est ainsi que des cultures peuvent déjà montrer des cristaux le deuxième ou le troisième jour, alors qu'en général, ceux-ci n'apparaissent que vers les cinquième, sixième jours et plus tard.

Un autre exemple de l'influence de l'« *éducation de la semence* » nous est fourni par l'observation suivante. Au début de mes recherches, le type de *B. chlororaphis* que j'étudie attaquait très peu les sucres mis à sa disposition. Je le cultivais alors uniquement sur bouillon peptoné. A cette époque, le saccharose était sensiblement respecté, aujourd'hui ce sucre fermente activement. Il semble donc que l'*éducation de la semence* a permis de sélectionner des races différentes du type moyen. Cette hypothèse semblerait impliquer que l'échantillon étudié de *B. chlororaphis* n'est pas homogène. En effet, c'est ce que nous avons eu maintes fois l'occasion de constater.

Cette question d'« *éducation de la semence* » ne suffit pas d'ailleurs à elle seule pour expliquer toutes les variations que j'ai eu l'occasion d'observer; le problème, dans son ensemble, est beaucoup plus complexe. Je rappellerai qu'alors que la majorité des cultures ne manifeste plus à 35° C. la faculté de donner des cristaux, il en est qui offrent une belle production de chlorora-

phine à cette température, et même quelques-unes, très rares, qui présentent encore des formes cristallines à 37°. D'autre part, alors que quelques germes ensemencés sur milieu synthétique y déterminent l'apparition d'une coloration jaune, d'autres provoquent un léger brunissement de la culture.

De plus, certaines semences transportées sur gélatine (en tube) liquéfient le substratum avec formation à la surface de la partie liquéfiée d'une pellicule rosée.

Enfin, non seulement les variations s'expriment par des colorations différentes du milieu de culture, par une production variable de cristaux, mais encore par la propriété de faire fermenter les sucres. De même, nous avons vu que les milieux galactosés n'offrent généralement pas de cristaux.

Or, la réduction (par Zn et HCl) de ces cultures y détermine un très léger verdissement, et le sucre est peu attaqué. Cependant, certaines semences peuvent faire fermenter cet hexose et les cultures offrir de rares cristaux, tandis que la réduction du milieu fait apparaître une magnifique teinte verte.

En résumé, des semences différentes peuvent donner, dans un même milieu, des cultures présentant des caractères variables. PASTEUR (1876), A. FITZ (1876-1882), PERDRIX (1891), GRIMBERT (1893), etc., étaient déjà arrivés à des conclusions analogues.

Les variations physiologiques les plus importantes apportées dans les cultures de *B. chlororaphis* semblent être sous la dépendance de l'origine de la semence et de l'âge de la culture dans laquelle elle est prélevée. Enfin, nous avons vu qu'il est possible, par des passages appropriés, d'exalter ou d'atténuer les différentes fonctions d'une semence donnée.

MÉCANISME DE FORMATION DES CRISTAUX VERTS

Nous avons vu que, dans certaines conditions d'expériences, la précipitation des cristaux est faible ou nulle, mais qu'en revanche, on peut par l'action du Zn et de l'HCl, faire apparaître

dans les cultures une teinte verte (1). Considérons une culture présentant un ou deux amas cristallins et qui, d'ici vingt-quatre ou quarante-huit heures, donnera une abondante production de cristaux verts. J'ai émis l'hypothèse qu'à ce moment, la chlororaphine existe déjà dans le milieu sous la forme d'une substance mère soluble à laquelle j'ai donné le nom de *xanthoraphine*.

Je vais d'abord démontrer que l'apparition de la *xanthoraphine* précède celle de la *chlororaphine*. A cet effet, des ballons sontensemencés et on prélève aseptiquement dans une même culture et à intervalles réguliers des échantillons qui, après filtration, sont réduits en liqueur acide.

ÉCHANTILLON PRÉLEVÉ APRÈS	APPARITION DES CRISTAUX dans la culture	REDUCTION DU FILTRAT par Zn et HCl
12 heures d'ensemencement.	»	Pas de coloration
24 — — —	»	—
36 — — —	»	—
48 — — —	»	—
72 — — —	»	Teinte verdâtre fugace
96 — — —	»	Légère teinte verte
108 — — —	»	Coloration verte
120 — — —	Quelques rares cristaux	Coloration verte, intense
144 — — —	Cristaux abondants	Coloration verte un peu plus faible

Il ressort de cette expérience que la Bactérie produit d'abord une substance soluble susceptible de verdier par réduction et ce n'est que lorsque ce corps est en quantité suffisante dans le milieu que la précipitation des cristaux s'effectue.

Cette substance soluble n'est autre que la *xanthoraphine*. Nous verrons plus loin qu'il est possible d'isoler ce chromogène des cultures sous la forme d'un corps cristallisé soluble donnant, par réduction en milieu acide, une belle teinte verte; de plus, les cultures ainsi privées de *xanthoraphine* ne verdissent plus sous l'action de Zn et HCl.

La *xanthoraphine* existe dans toutes les cultures pouvant

(1) Je rappelle que cette coloration n'a rien de commun avec le chromogène fluorescent, et il reste bien entendu que j'étudie exclusivement les chromogènes du groupe de la *chlororaphine*.

verdir par réduction même dans celles qui semblent n'offrir aucune teinte jaune; d'ailleurs, filtrées sur bougies Chamberland, elles donnent toujours un liquide jaune plus ou moins foncé. La filtration met donc en évidence la présence du chromogène qui n'était apparent que dans les cultures colorées et que, seule, la réduction décelait dans les milieux paraissant incolores.

Nous venons de démontrer que l'existence de la xanthoraphine dans les cultures précède l'apparition des cristaux verts. Il nous reste à prouver que c'est aux dépens de ce chromogène que ceux-ci s'organisent, ce qui revient à déterminer le mécanisme de précipitation des formes cristallines.

On sait que la production de certains chromogènes bactériens est sous la dépendance de phénomènes d'oxydation (exemple de la pyocyanine, de la syncyanine), mais le jaunissement des cristaux verts sous l'influence de l'air et les propriétés nettement réductrices de toutes les cultures de *B. chlororaphis* dans lesquelles la chlororaphine s'est précipitée plaident peu en faveur d'une intervention oxydante.

L'expérience suivante conduit à la même conclusion. Des cultures donnant par Zn et HCl une belle teinte verte sont filtrées sur bougie et le filtrat obtenu est fractionné. Certaines parties sont soumises à des modes d'oxydation variés, d'autres sont réduites par des réducteurs divers. Les premières ne donnent jamais de cristaux et lorsqu'une coloration apparaît, elle varie du rose au rouge vineux.

La réduction en milieu acide donne une teinte verte, mais jamais de formes cristallines, ce que l'on comprend aisément si l'on sait que les cristaux verts sont solubles dans les acides; nous avons vu, d'ailleurs, les formes cristallines se précipiter presque toujours en milieu alcalin et bien exceptionnellement en présence d'une acidité extrêmement faible. Il était donc logique d'orienter les recherches vers l'emploi de réducteurs agissant en milieu neutre ou alcalin. Après de nombreux essais, j'ai adopté le mode de réduction suivant :

La culture filtrée est additionnée de sulfate d'ammoniaque, de lamelles de Zn et de fer en fil. On la porte à 40° C. pendant

quelques minutes pour amorcer la réaction et on l'abandonne à la température du laboratoire. La réduction est très lente; au bout de vingt-quatre heures, généralement, on observe la formation d'un précipité cristallin très fin en suspension dans le liquide. Vers la quarante-huitième heure, le précipité commence à se déposer au fond du vase sous l'aspect de flocons verdâtres. Après soixante-douze heures, la réaction est terminée. L'examen microscopique montre de magnifiques cristaux verts présentant les mêmes groupements cristallins que dans les cultures. On peut améliorer sensiblement la méthode en transvasant le liquide dans un autre récipient dès l'apparition du louche cristallin dans le filtrat réduit et en y ajoutant un peu de sulfhydrate d'ammoniaque. On obtient ainsi, après quelques heures, d'admirables cristaux verts qui souvent flottent à la surface du liquide et peuvent former un voile d'un vert magnifique. Les cristaux verts sont-ils de la chlororaphine?

L'examen microscopique montre les rosaces, les faisceaux, les houppes que l'on trouve dans les cultures.

D'autre part, le point de fusion de la chlororaphine n'étant pas assez précis, nous allons transformer nos cristaux verts en cristaux jaunes insolubles et nous comparerons le point de fusion du corps ainsi obtenu avec celui de l'oxychlororaphine. A cet effet, les cristaux verts sont dissous dans l'acétone. Dans cette solution se déposent des cristaux jaunes fondant à 236-237° C. De plus, mélangés à l'oxychlororaphine, le mélange fond également à 236-237°. L'oxychlororaphine fondant à 236°,8 (Fc), on peut conclure qu'il y a identité complète entre les cristaux obtenus par réduction chimique de la xanthoraphine et ceux précipités dans les cultures sous l'influence du Bacille.

Il est à remarquer que j'opérais sur un liquide filtré et d'une richesse saline considérable qui devait entraver tout développement bactérien; néanmoins, pour éviter toute critique, j'ai répété les expériences en opérant en milieu rigoureusement aseptique. A cet effet, le liquide filtré était distribué dans des vases stérilisés, le zinc et le fer d'une part, le sulfate d'ammoniaque de l'autre l'étaient aussi séparément. De plus, je me suis assuré

que, pendant toute la durée de la réaction, aucun développement microbien ne s'était produit dans la liqueur réduite. Même en opérant ainsi, j'ai obtenu des résultats rigoureusement identiques aux premiers.

Il résulte de ces essais que la chlororaphine dérive par réduction de la xanthoraphine qui, sous l'action de HCl et Zn, colorait en vert les cultures filtrées.

La précipitation des formes cristallines dans les milieux de culture est donc sous la dépendance d'agents réducteurs.

Mais si nous connaissons le rôle capital de la réduction dans la formation des cristaux, nous ignorons encore la nature des agents réducteurs; doit-on attribuer ce phénomène à une intervention diastasique ou à l'avidité considérable de la Bactérie pour l'oxygène? D'autre part, si nous avons démontré comment s'effectue le passage de la substance soluble au composé insoluble, nous n'avons fait encore aucune recherche pour essayer de déterminer par quel mécanisme s'édifie la molécule de xanthoraphine.

L'édification est-elle sous la dépendance d'un phénomène réducteur ou d'une oxydation, ou bien encore des deux actions agissant simultanément ou successivement? Autant de questions qui nous conduisent à la recherche des diastases dans les cultures de *B. chlororaphis*.

Lorsqu'on cultive le Bacille en présence de soufre précipité, de sulfoindigotate de soude, de sels ferriques, de chlorhydrate de tétraméthyl-paraphénylène-diamine, on constate que les liqueurs sont réductrices. J'ai essayé de déceler la présence de diastases en opérant directement sur des cultures d'âges variables. A cet effet, j'ai utilisé les réactifs ci-dessous :

Chlorhydrate de tétraméthyl-paraphénylène-diamine	{ Solution incolore ; Solution bleue ;
Teinture de résine de gaïac ;	
Teinture de résine de gaïac et H_2O_2 ;	
Hydroquinone ;	
Pyrogallol ;	
Oxydes manganoux et manganique.	

Tous les essais ont été effectués comparativement avec des tubes de culture portés préalablement à l'ébullition et avec des milieux non ensemencés. Dans aucun cas, je n'ai mis en évidence de caractères oxydants de la liqueur, je n'ai pu que confirmer le pouvoir réducteur.

On peut émettre l'hypothèse que le milieu renferme des agents oxydants et réducteurs, mais que l'action réductrice l'emporte sur l'oxydation. J'ai alors effectué une série d'essais pour tenter de mettre en évidence successivement chacun des agents de ces deux groupes. J'ai, à cet effet, à l'aide des réactifs cités plus haut, recherché les caractères des cultures dans des conditions spéciales :

1° En effectuant le mélange culture-réactif à des températures variant de 17° à 40° C;

2° En modifiant préalablement la réaction du milieu, la rendant successivement acide, neutre, alcaline à l'hélianthine et à la phénolphtaléine, avant l'introduction des réactifs;

3° En filtrant sur bougie Chamberland et Berkefeld;

4° En utilisant l'influence de la réaction du milieu sur la filtrabilité des diastases (HOLDERER, 1909-1910);

5° En procédant à des précipitations fractionnées par l'alcool;

6° En portant préalablement les cultures à des températures variant de 50° à 100° C.

Les essais 1 et 2 montrent que lorsque les cultures ont une action sur les réactifs, cette action est toujours de nature réductrice.

Les filtrats provenant de bougies Chamberland ou Berkefeld ne présentent ni caractères réducteurs ni caractères oxydants. Abandonnés aseptiquement soit à la température du laboratoire, soit à celle de l'étuve, ils ne donnent jamais de cristaux. La modification préalable de la réaction de la liqueur à filtrer n'influence nullement la nature du filtrat qui présente les mêmes caractères négatifs que ci-dessus. La précipitation par l'alcool donne des résultats du même ordre. Enfin, les cultures chauffées sont réductrices tant que la Bactérie n'est pas affaiblie ou tuée; au-dessus de la température mortelle, le caractère réducteur cesse de se manifester.

De ces essais, il résulte que le pouvoir réducteur de la culture disparaît lorsqu'on la prive de cellules microbiennes vivantes. Il n'a pas été possible de constater l'existence de diastases oxydantes ou réductrices, ce qui, d'ailleurs, n'infirme pas leur existence. Néanmoins, le pouvoir réducteur pourrait s'expliquer par l'avidité considérable de la Bactérie pour l'oxygène.

La précipitation de la chlororaphine est donc sous la dépendance d'un phénomène de réduction. En étudiant l'influence de l'oxygène sur la production de la chlororaphine, nous sommes arrivé à des conclusions analogues.

XANTHORAPHINE

Nous avons démontré que les cristaux verts dérivent par réduction d'une substance soluble dans l'eau que nous avons désignée sous le nom de xanthoraphine, c'est cette substance que nous allons étudier. Mais, auparavant, afin d'éviter toute confusion entre les composés cristallins, je rappellerai le schéma indiquant comment dérivent l'un de l'autre les corps colorés.

Xanthoraphine	<i>réduction</i> →	Chlororaphine	<i>Oxydation</i> →	Oxychlororaphine
—		—		—
Substance jaune		Substance verte		Substance jaune
cristallisable		cristalline		cristalline
soluble		insoluble		extrêmement
dans l'eau.		dans l'eau.		peu soluble
				dans l'eau.

Extraction. — L'oxychlororaphine présentant, comme nous le verrons plus loin, toutes les propriétés des alcaloïdes, il est logique de rechercher si la culture renfermant la xanthoraphine précipite par les réactifs des bases alcaloïdiques. L'expérience vérifie cette hypothèse et les cultures ainsi traitées donnent par filtration un liquide qui n'offre plus de teinte verte par réduction. La xanthoraphine a donc été complètement précipitée et l'extraction de cette substance est basée sur cette propriété. J'ai opéré comparativement avec des cultures filtrées sur papier et d'autres filtrées sur bougie Chamberland. Ces derniers filtrats offrent l'avantage de donner ultérieurement des liqueurs d'une

filtration beaucoup plus rapide du fait de l'élimination des corps microbiens. Le tanin et l'oxyde de plomb permettent d'obtenir la xanthoraphine à l'état cristallin. A cet effet, la culture filtrée est additionnée d'un excès d'une solution aqueuse de tanin. Après agitation, on abandonne quelque temps la liqueur au repos, puis, on centrifuge et on décante le liquide clair surnageant. Le précipité est remis en suspension dans l'eau et on centrifuge à nouveau. Ces opérations doivent être répétées plusieurs fois lorsqu'il s'agit de cultures filtrées sur papier afin d'éliminer le plus possible les corps microbiens.

Enfin, le précipité est essoré rapidement, remis en suspension dans l'eau et traité par l'oxyde de plomb. On porte le mélange quelques instants au B. M. à 40°-50°, puis, on abandonne à la température du laboratoire. Au bout de vingt-quatre heures, on décante le liquide surnageant, le résidu est épuisé par l'eau une ou deux fois. On réunit entre eux les liquides provenant de ces épuisements et, après filtration, on évapore à basse température et sous pression réduite à quelques centimètres cubes. La xanthoraphine cristallise par refroidissement. On la purifie par une deuxième cristallisation. Il n'est pas possible de pousser la purification aussi loin qu'on le voudrait à cause de l'instabilité de ce corps dont l'obtention très délicate exige de grandes précautions.

L'acide silicotungstique et l'ammoniaque (G. BERTRAND (1899)), l'acide phosphomolybdique et la baryte donnent de mauvais résultats; néanmoins, les rendements sont un peu améliorés par la substitution de l'oxyde de plomb à la baryte.

Propriétés. — La xanthoraphine récemment extraite se présente sous la forme d'une poudre jaune brun; elle cristallise en prismes ou en aiguilles. Chauffée, elle émet des vapeurs âcres qui, condensées, donnent des cristaux jaunes; puis, elle fond sans présenter de point de fusion net et se décompose.

Elle est très soluble dans l'eau qu'elle colore en jaune plus ou moins foncé suivant la concentration de la liqueur. Elle est très peu soluble dans l'acétone et presque entièrement

insoluble dans l'alcool éthylique; l'alcool amylique, par contre, et le chloroforme en dissolvent d'assez grandes quantités, beaucoup moins que l'eau cependant.

La xanthoraphine se dissout dans les acides. Sa solution aqueuse, réduite par Zn et HCl, offre une coloration verte, tandis que la réduction en milieu neutre par le zinc, le fer et le sulfate d'ammoniaque permet l'obtention de cristaux verts. Ces cristaux dissous dans l'acétone donnent, par cristallisation, l'oxychlororaphine.

La xanthoraphine est une substance très instable et qui subit des modifications profondes lorsqu'elle est conservée à l'air à la température du laboratoire. Abandonnée plusieurs jours à 40°, elle passe du jaune brun au jaune pâle. Sous cette forme, elle ne se dissout plus entièrement dans l'eau et, même à l'ébullition, il reste des aiguilles jaune serin qui refusent de se dissoudre. D'ailleurs, la réduction de la substance modifiée ne donne plus qu'une teinte verdâtre faible. A la température de 100°, la décomposition est beaucoup plus rapide et elle est encore accentuée par la présence de bases.

En résumé, la xanthoraphine est une substance jaune cristallisable sans point de fusion net. Elle est très soluble dans l'eau et les acides. Réduite en milieu acide, elle donne une coloration verte, tandis que la réduction en milieu neutre précipite des cristaux verts qui par oxydation se transforment en oxychlororaphine. La xanthoraphine précipite par les réactifs des alcaloïdes. Elle se décompose avec une grande rapidité au contact de l'air.

BRUNISSEMENT DES CULTURES DE BACILLUS CHLORORAPHIS

Après avoir étudié le mécanisme de formation des cristaux verts, il nous reste à rechercher les causes du brunissement de certaines cultures.

En milieu synthétique type, on note parfois une légère fluorescence qui, bientôt, est remplacée par une teinte jaune brun ou brune. Le brunissement est beaucoup plus net en présence

d'acide aspartique et d'ammoniaque; les cultures sur milieux renfermant ces corps offrent généralement au début une belle fluorescence à laquelle succède bientôt une teinte rose ou jaune brun, puis brune.

Pour tenter l'explication de ce phénomène, il est bon de rappeler d'abord les travaux effectués dans cet ordre d'idées par GESSARD (1901-1902). Cet auteur a montré que certains germes pyrocyaniques produisent un pigment rouge et noir à condition de se trouver en présence de tyrosine. Il a assimilé ce pigment au chromogène de même couleur que donne la tyrosine sous l'influence de sa diastase oxydante : la tyrosinase. J'ai donc recherché si la coloration brune de certaines cultures de *B. chlororaphis* était due à un phénomène analogue. A cet effet, j'ai approprié la technique de l'auteur aux exigences de *B. chlororaphis*. Des milieux synthétiques types, différant entre eux par la proportion des éléments constitutants et des milieux divers sont additionnés de tyrosine à doses variables. La présence de ce composé phénolique dans ces différents bouillons n'a jamais influencé la production de la teinte brune. D'autre part, des cultures fluorescentes ou jaunes ont été additionnées de solution stérile de tyrosine sans que cette substance ait jamais provoqué le brunissement des cultures.

Enfin, je rappellerai que les cultures de *B. chlororaphis* sur pomme de terre, dahlia, lait, ne présentent jamais un brunissement ou un noircissement capable d'évoquer la présence dans ces cultures d'un agent oxydant de la tyrosine.

GESSARD fait aussi remarquer que la production du pigment rouge ou noir dépend non seulement de la présence de la tyrosine, mais encore du rapport dans lequel se trouvent les éléments constitutants du milieu et de l'« aptitude fonctionnelle du microbe ».

J'admettrais donc que je n'ai su réaliser les conditions favorables à la production du pigment si d'autres faits ne me permettaient de donner une explication plus satisfaisante du brunissement.

Nous avons vu, lors de l'étude de la fonction fluoresceigène, que l'addition de fer aux milieux favorables à la production

de la fluorescence masque cette dernière et fait apparaître une teinte jaune du milieu.

Nous savons aussi que les milieux synthétiques types dépourvus de fer donnent des cultures fluorescentes, mais ne brunissant jamais.

Il semble donc que la coloration brune ne puisse se manifester que dans les milieux renfermant du fer.

La fluorescence qui se manifeste au début dans les milieux synthétiques types qui doivent brunir plus tard persiste quelques jours; or, nous savons qu'à mesure que la végétation se poursuit, du fer se redissout dans le milieu.

Ce n'est donc que lorsque la culture renferme une quantité suffisante de fer dissous que la fluorescence disparaît. D'ailleurs, l'examen des cultures en milieu aspartique conduit aux mêmes conclusions; alors que la partie supérieure est encore fluorescente, la partie inférieure, plus riche en fer, est déjà brune ou jaune brun, la partie moyenne présentant une coloration intermédiaire entre la fluorescence verte et la teinte brune.

On peut vérifier aisément que l'addition de fer à des cultures fluorescentes vertes détermine instantanément une coloration rose, rougeâtre, jaune brun ou brune suivant l'intensité de la fluorescence et la quantité de fer ajouté. Cette coloration peut même apparaître avec des quantités extrêmement faibles de fer. Ainsi, des cultures très fluorescentes additionnées à des solutions de sulfate de fer donnent encore une coloration avec des doses de 1/200.000 de Fe.

De plus, nous avons vu que si on précipite à l'aide de NH_3 , ou de sulfhydrate d'ammoniaque le fer existant dans les liqueurs brunies, la fluorescence réapparaît.

Enfin, si par des opérations appropriées, on isole à un état de pureté relative le pigment fluorescent, l'addition de fer à la solution de ce chromogène en détermine le brunissement.

Tous ces faits tendent à montrer que la coloration brune de certaines cultures de *B. chlororaphis* ne semble pas être sous la dépendance d'un phénomène analogue à celui signalé par GES-SARD, mais paraît due à une combinaison du fer et du chromogène fluorescent.

CHLORORAPHINE ET OXYCHLORORAPHINE

Formes cristallines dans les cultures. — La propriété caractéristique de *B. chlororaphis* est de donner, dans les milieux de culture, des cristaux vert émeraude à côté desquels on peut en observer parfois d'autres vert bleu, plus rarement vert foncé presque noir; mais ces formes ne se rencontrent, en général, que dans les cultures jeunes seulement. A mesure que le pouvoir réducteur du milieu diminue avec l'âge, les cristaux verts jaunissent, si bien que l'examen microscopique montre, à côté de cristaux verts, des formes cristallines jaunes et souvent des faisceaux d'aiguilles-vertes à une extrémité et jaunes à l'autre. Dans quelques cas, les cristaux restent verts plusieurs mois lorsqu'ils sont soustraits à l'action oxydante de l'air. La coloration dépend, en effet, des circonstances qui favorisent l'oxydation ou la réduction: ainsi, une culture de six jours à magnifiques cristaux verts est mise à l'étuve à 45°; en quarante-huit heures tous les cristaux sont devenus jaunes, c'est que, dans ce cas, la température a agi: 1° en arrêtant la végétation et en diminuant, de ce fait, le pouvoir réducteur; 2° en favorisant l'oxydation qui, ainsi que nous l'avons signalé, transforme la chlororaphine en oxychlororaphine jaune. Certaines cultures en bouillon, dans lesquelles la production des cristaux est en dégénérescence, présentent, à la surface du voile, des arborisations cristallines jaunes. On en observe parfois d'analogues à la surface de certaines plaques de gélose. En dissolvant dans l'acétone ces formes arborescentes constituées, le plus souvent, par des prismes ou de courtes aiguilles jaune pâle, on obtient, par cristallisation, des cristaux de forme et de coloration semblables à ceux de l'oxychlororaphine. Ils fondent à 236°-237° et leur solution devient verte sous l'action de Zn et HCl; il ne s'agit donc pas d'une substance nouvelle, mais simplement d'un mode de cristallisation différent de l'oxychlororaphine.

Lieux d'apparition de la chlororaphine. — Peu de temps après l'isolement, vers 1907, lorsqu'ils se produisaient en milieux

liquides, les cristaux verts se formaient presque exclusivement à la surface de la culture, en plein voile, et étaient soutenus par lui; ils tombaient au fond du vase lorsqu'ils avaient atteint un développement suffisant. Actuellement, ils apparaissent indifféremment contre les parois du vase ou en plein voile. Lorsque le degré de cohérence du voile lui permet de soutenir longtemps les cristaux, les petits points verts de la culture finissent parfois par devenir des rosaces ou des faisceaux franchement cristallins à l'œil nu. Ces formes s'observent plus fréquemment lorsque les cristaux se déposent dès le début contre les parois du vase.

Examen microscopique des cristaux. — Les cristaux ont la forme d'aiguilles longues et flexueuses, plus rarement nettement prismatiques, souvent réunies en faisceaux ou disposées en rosaces; elles peuvent aussi former des mâcles, des houppes (fig. 3).

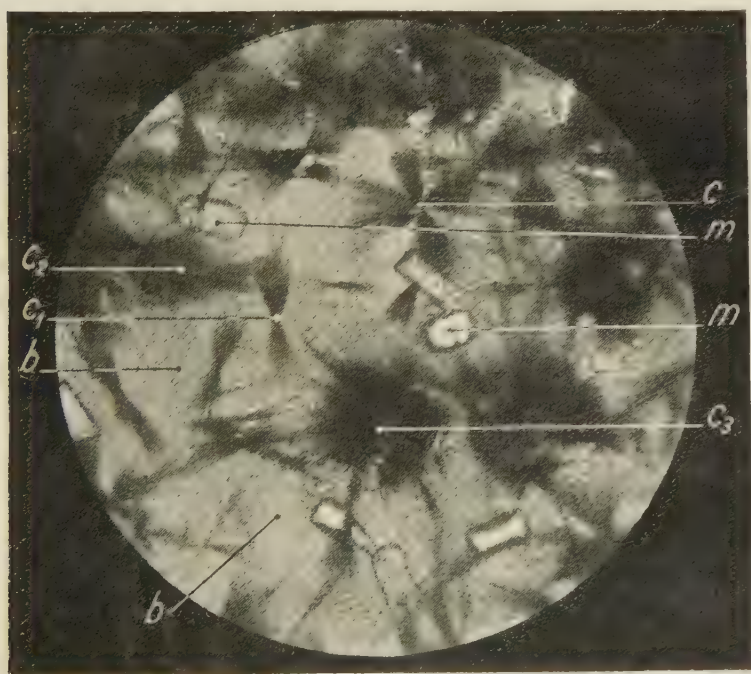


Fig. 3. — Culture sur bouillon synthétique type. Photographie d'un fragment du voile, $\times 400$ environ.

C, C₁, C₂, C₃; cristaux de chlorophylline montrant des groupements cristallins variables (C₁, faisceau; C₂, houppe; C₃, rosace); — m, cristaux minéraux; b, corps bactériens du voile

Ces modes de cristallisation avaient conduit GUIGNARD et SAUVAGEAU à rapprocher la chlororaphine de la tyrosine.

Extraction de la chlororaphine. — C'est aux milieux liquides que l'on s'adressera pour l'isolement de la substance verte et de préférence aux milieux synthétiques. Les bouillons peptonés ne permettent, en effet, qu'une faible production de chlororaphine; ils deviennent, en outre, très visqueux en vieillissant, ce qui rend les filtrations extrêmement lentes et pénibles.

La culture dont on veut extraire les formes cristallines est essorée; puis, le précipité est remis en suspension dans l'eau; on centrifuge et on décante la partie liquide, toujours très opalescente par suite de la présence des corps bactériens. Le précipité est remis à nouveau en suspension dans l'eau et on profite de la légèreté de la chlororaphine pour la séparer, par décantation, des cristaux minéraux qui se forment toujours dans les cultures. On répète les centrifugations et décantations jusqu'à ce que les eaux de lavage n'entraînent plus de cellules bactériennes. Enfin, le précipité est essoré une dernière fois.

La chlororaphine ainsi obtenue est toujours impure, elle ne saurait être utilisée pour des réactions précises et il est nécessaire de purifier les cristaux ainsi isolés. L'extrême facilité avec laquelle la chlororaphine s'oxyde, surtout à l'état de solution ou à la température de sa fusion, impose l'obligation d'effectuer sa purification en l'absence d'oxygène. Cette opération peut être faite par deux modes différents : la cristallisation et la sublimation.

Purification par cristallisation. — La cristallisation est effectuée à l'aide de l'appareil schématisé page 109. Le ballon *A*, refroidi à 0°, sert de réservoir à l'acétone. En *B* le solvant est porté à l'ébullition. Un long tube *S* plonge dans le mercure, il sert de soupape de sûreté et de tube barométrique. La substance verte est introduite par la tubulure *T* dans le ballon *C*, où s'effectue l'épuisement de la chlororaphine. La solution est filtrée en *D* sur coton préalablement épuisé à l'acétone. En *E* les liqueurs

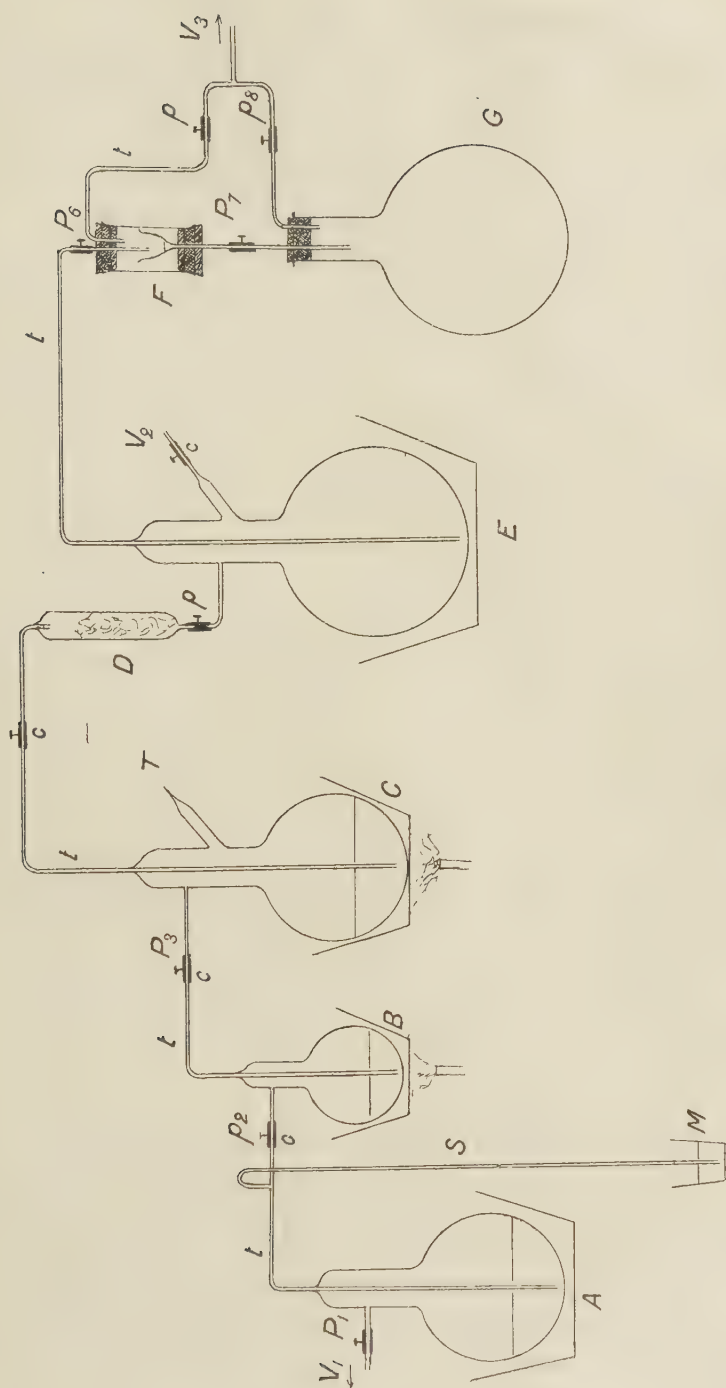


Fig. 4. — Appareil pour la purification de la chlororaphine.

A, B, C, E, G, ballons pouvant à volonté être chauffés ou refroidis.
D, tube à colonne de cuate filtrante.
F, tube à essorer.
P₁, P₂, P₃ etc., pinces à vis.
t, tube de verre.
c, tube de caoutchouc.
M, mercure.

A, B, C, E, G, ballons pouvant à volonté être chauffés ou refroidis.
D, tube à colonne de cuate filtrante.
F, tube à essorer.
P₁, P₂, P₃ etc., pinces à vis.
t, tube de verre.
c, tube de caoutchouc.
M, mercure.

d'épuisement après réunion sont concentrées, par évaporation dans le vide V_2 , jusqu'à saturation. Puis le contenu du ballon E est refroidi vers -5° ou -10° C. et agité jusqu'à précipitation complète des formes cristallines. Enfin, les cristaux sont essorés en F et les eaux mères recueillies en G . En compliquant un peu l'appareil, on peut utiliser ces eaux mères en les ramenant dans le ballon C . On isole F et les cristaux sont desséchés dans le vide V_3 . Le maniement de l'appareil est trop simple pour que j'entre dans de longs détails opératoires. Je ferai seulement remarquer que la pince P_3 étant fermée, on fait le vide simultanément ou successivement en V_1 et V_3 , de telle façon que l'acétone n'arrive au contact de la substance que lorsque tout l'air est expulsé de l'appareil et remplacé par une atmosphère d'hydrogène ou d'azote.

Nous avons vu dans les cultures, à côté de cristaux verts, des formes cristallines jaunes et d'autres mi-partie verte, mi-partie jaune. La cristallisation étant effectuée à l'abri de l'air nous donne donc une substance verte à l'œil nu, mais dans laquelle le microscope montre sensiblement les mêmes nuances que dans la substance primitive isolée des cultures. Aussi, pour obtenir exclusivement des cristaux verts, j'ai dû utiliser deux procédés très délicats. L'un est basé sur la propriété qu'a la chlororaphine d'être plus soluble dans l'acétone que l'oxychlororaphine, et de se précipiter la dernière lors de la cristallisation d'un mélange de ces deux substances. On peut, par des cristallisations fractionnées, arriver à éliminer de plus en plus les cristaux jaunes du mélange initial, mais cette méthode, longue et pénible, donne de mauvais rendements.

Le second procédé est préférable; il consiste à traiter rapidement par le chloroforme la substance isolée des cultures. L'oxychlororaphine est dissoute tandis que la chlororaphine est sensiblement respectée; il est, toutefois, nécessaire d'opérer à l'abri de l'air. Après avoir été rapidement essorée, la substance qui a résisté à l'action du chloroforme est introduite dans le ballon C et on continue l'opération comme à l'ordinaire. Quels que soient le procédé utilisé et les précautions prises, on n'est jamais abso-

lument certain d'obtenir des cristaux verts rigoureusement exempts d'oxychlororaphine.

Purification par sublimation. — Ce procédé, que j'ai peu utilisé, ne donne pas de meilleurs résultats que le premier et, s'il est réalisé, avec un appareil plus simple, il n'en exige pas moins de grandes précautions, afin d'éviter toute décomposition de la chlororaphine. La sublimation est exécutée dans une atmosphère d'azote ou d'hydrogène et en l'absence rigoureuse d'oxygène, car, à cette température élevée, l'oxydation de la chlororaphine est instantanée.

Avec les cristaux tels qu'ils ont été retirés des cultures, le produit de sublimation est un mélange de substances verte et jaune. Il est par conséquent nécessaire de les traiter préalablement par le chloroforme, ainsi que je l'ai expliqué, pour les débarrasser de l'oxychlororaphine.

Il résulte donc de ce qui précède que l'obtention de chlororaphine exempte de forme oxydée est extrêmement délicate.

Obtention de l'oxychlororaphine. — Il n'en est pas de même pour ce qui concerne l'oxychlororaphine, que l'on peut obtenir avec une très grande facilité. A cet effet, les cristaux isolés des cultures sont dissous à chaud dans l'acétone.

La solution saturée et filtrée est refroidie à -10° ; par agitation, il se précipite de petits cristaux jaunes qui sont essorés et lavés avec quelques centimètres cubes d'acétone. On répète ces cristallisations jusqu'à obtention d'un corps à point de fusion constant.

Propriétés physiques de la chlororaphine. — Chauffée en l'absence d'oxygène, la chlororaphine se sublime vers 210° et donne des cristaux verts par condensation des vapeurs émises; tandis que, sublimée à l'air, elle donne des cristaux jaunes. Il est très difficile de déterminer exactement son point de fusion et cela pour plusieurs raisons dont la plus importante est son oxydation. En effet, lorsqu'on projette de petites parcelles de substance,

soit sur le mercure, soit sur le bloc de Maquenne chauffés vers 230° , on observe un éclair verdâtre. Une partie de la substance s'est sublimée, l'autre partie fondue est jaune, elle s'est oxydée durant la fusion. On peut espérer tourner la difficulté en prenant le point de fusion dans une atmosphère d'azote ou d'hydrogène avec le bain sulfurique. Mais en opérant ainsi, on voit, vers 190° , la substance devenir vert foncé, puis, la coloration fonce de plus en plus à mesure que la température s'élève pour arriver finalement au vert noir. Enfin, la substance fond vers 225° , le point de fusion n'est pas net et le noircissement des cristaux peut faire craindre une décomposition partielle. Il faudrait donc, à l'aide d'un dispositif spécial, pouvoir projeter la substance sur le mercure ou sur le bloc de Maquenne chauffés dans une atmosphère rigoureusement exempte d'oxygène. On arriverait par tâtonnement à déterminer la température pour laquelle la fusion de la substance est instantanée et, dans ce cas, on n'aurait pas à redouter un commencement de décomposition dû à un chauffage trop prolongé. Je n'ai pas pu réaliser un dispositif répondant à ces desiderata. Nous considérerons donc 225° comme voisin du point de fusion de la substance verte.

La chlororaphine est pratiquement insoluble dans l'eau, même à l'ébullition, ainsi que dans le sulfure de carbone, le chloroforme, l'éther de pétrole, le toluène, le xylène, le benzène et les alcalis; elle est faiblement soluble dans les alcools méthylique, éthylique. L'acétone, le phénol, l'aniline, les acides chlorhydrique, perchlorique, sulfurique, azotique, phosphorique, acétique, lactique, la dissolvent aisément. Son coefficient de solubilité dans l'acétone est plus grand que celui de l'oxychlororaphine; cette propriété a été utilisée dans la purification des formes cristallines isolées des cultures.

Le tableau suivant indique les colorations de diverses solutions de chlororaphine.

TABLEAU.

NATURE DU SOLVANT	SOLUTIONS DE CHLORORAPHINE	
	Coloration au début	Coloration après un certain temps
Acide chlorhydrique { dilué	Vert jaunâtre	Jaune
{ concentré	Vert foncé	Brun verdâtre
Acide azotique { dilué	Jaune	Jaune
{ concentré	Jaune	Jaune
Acide sulfurique { dilué	Vert brunâtre	Jaune brunâtre après quelques minutes.
{ concentré	Brun verdâtre	"
Acide acétique { dilué	Jaune verdâtre	Jaune après quelques minutes
{ concentré	Jaune	Jaune
Phénol	Jaune	Jaune
Acétone { en présence d'O ₂	Jaune verdâtre	Jaune pâle
{ en absence d'O ₂	Jaune verdâtre	Jaune verdâtre
Aniline	Jaune	Jaune

Enfin, la solution chlorhydrique faite à l'abri de l'oxygène est verte.

Propriétés chimiques de la chlororaphine. La chlororaphine, dans une atmosphère limitée d'oxygène pur, jaunit en absorbant ce gaz. Les essais effectués ayant porté sur une trop faible quantité de substance pure (0^{gr},050), je ne puis donner de chiffres indiquant la quantité d'oxygène absorbé pendant cette oxydation.

Dans l'air sec et à la température de la chambre, les cristaux exigent plusieurs semaines pour s'oxyder complètement. En présence de l'humidité et de la lumière, la réaction, beaucoup plus rapide, peut être complète en une semaine. Avec l'élévation de la température la rapidité de la réaction croît. Ainsi, à 40°, en présence d'eau, toute la substance n'est oxydée qu'en deux ou trois jours, tandis qu'elle l'est en quelques minutes vers 150°-180° et en quelques secondes à 220°.

A l'état de solution, l'oxydation est très rapide. La difficulté considérable que l'on éprouve à préserver la chlororaphine de l'oxydation fait que j'ai délaissé son étude pour celle de son dérivé, l'oxychlororaphine, qui est beaucoup plus stable et s'obtient plus facilement.

Propriétés physiques de l'oxychlororaphine. La forme des cristaux est variable avec la nature du solvant et le mode de cris-

tallisation; ils n'atteignent pas de dimensions suffisantes pour être déterminables cristallographiquement; généralement, ils offrent l'aspect d'aiguilles plus ou moins allongées, parfois de prismes ou de longs filaments flexueux.

Par évaporation lente d'une solution cétonique, on obtient de fines aiguilles pouvant atteindre et dépasser 1 centimètre de longueur et groupées en houppes ou en rosaces. Par contre, la cristallisation troublée donne de petits cristaux qui se feutrent à l'essorage et, de ce fait, rendent assez pénible la manipulation de la substance.

L'oxychlororaphine chauffée à l'air émet des vapeurs âcres qui, par condensation, donnent des formes cristallines jaune-pâle, la sublimation dans une atmosphère de gaz inerte donne de magnifiques cristaux jaunes fondant à 241°, alors que la substance pure, obtenue par cristallisation, fond brusquement à 236°,8 (F. c.).

La différence constatée entre le point de fusion de la substance primitive et celui du produit sublimé peut être expliquée par les deux hypothèses suivantes :

1° L'oxychlororaphine est un mélange, et, parmi les composants, l'un se sublime plus facilement que les autres;

2° La sublimation est accompagnée d'un commencement de décomposition.

Malheureusement, la faible quantité de substance dont j'ai pu disposer dans ce but, ne m'a pas permis de les vérifier.

La solubilité de l'oxychlororaphine dans l'eau croît avec la température; 100 grammes d'eau dissolvent 0^{gr}.010 de substance à 15° et 0^{gr}.120 à 100°. L'oxychlororaphine est insoluble dans la benzine, l'éther de pétrole, faiblement soluble dans les alcools éthylique et méthylique et l'éther, assez soluble dans le chloroforme et l'aniline, soluble dans l'acétone qui en dissout 0^{gr}.150 % à 15° et 0^{gr}.740 % à l'ébullition.

Les acides minéraux (*solutions commerciales*) concentrés ou étendus au tiers ou au quart, dissolvent aisément les cristaux jaunes. Dans les acides très étendus, les solutions normales

ou $\frac{N}{10}$, le coefficient de solubilité de la substance est sensible-

ment le même que dans l'eau. Les acides acétique, lactique, succinique, sont d'assez bons solvants de l'oxychlororaphine.

Par contre, les alcalis concentrés ne peuvent la dissoudre. Les solutions alcalines normales ou $\frac{N}{10}$ se comportent sensiblement comme l'eau en tant que dissolvant.

L'oxychlororaphine, en solution cétonique, acétique ($0^{\text{gr}},291$ de substance dans 20 centimètres cubes d'acide), est inactive sur la lumière polarisée.

Composition. — *Recherche des éléments minéraux.* — Étant donnée l'origine de l'oxychlororaphine, on pouvait espérer y détecter des éléments minéraux. Le tableau ci-dessous indique les résultats des recherches effectuées dans cet ordre d'idées.

POIDS DE SUBSTANCE examinée	ÉLÉMENTS CHERCHÉS	MÉTHODES EMPLOYÉES	ÉLÉMENTS TROUVÉS
grammes			
0,1524	Soufre	Carius	0
0,1304	Phosphore	Carius	0
0,1204	Halogènes	Carius	0
0,0891	Halogènes	A la chaux	0

D'autre part, la calcination ménagée de $0^{\text{gr}},1514$ de substance ne donne pas de cendres.

Les cristaux, ne renfermant pas d'éléments minéraux, ne peuvent donc être composés que de C, H, O, N, c'est sur quoi l'analyse va nous renseigner.

Dosage du carbone et de l'hydrogène

I. $0^{\text{gr}},1389$ de substance ont donné $0^{\text{gr}},3566$ de CO_2 et $0^{\text{gr}},0543$ de H_2O
 II. $0^{\text{gr}},1327$ — — — $0^{\text{gr}},3409$ de CO_2 et $0^{\text{gr}},0500$ de H_2O

Soit pour cent :

	I	II
C	70,02	70,06
H	4,37	4,20

Dosage d'azote

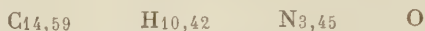
I. 0^{gr},1497 de substance ont donné 24^{cm}3,2 d'N mesuré humide à 6°
sous 754^{mm},5

II. 0^{gr},1139 de substance ont donné 19^{cm}3 d'N mesuré humide à 14°,5
sous 729^{mm}

Soit pour cent :

	I	II
N	19,54	19,44

Le corps répond donc à la formule brute suivante :



Cryoscopie

La substance est dissoute dans l'acide acétique

POIDS DE SUBSTANCE DISSOUTE dans 100 gr. d'acide acétique	ABAISSEMENT du point de congélation	POIDS MOLÉCULAIRE TROUVÉ
4,90	0°,830	230
2,87	0°,495	226
1,98	0°,345	224

Poids moléculaire à l'origine : 222

Poids moléculaire calculé pour :

(1)	$\text{C}_{14} \text{H}_{10} \text{N}_3 \text{O} = 236$
(2)	$\text{C}_{15} \text{H}_{11} \text{N}_3 \text{O} = 263$

J'ai calculé le poids moléculaire pour (1) et (2), car les données analytiques nous ont conduit au schéma suivant :



dans lequel l'exposant de chaque élément comprend une fraction très voisine d'une demi-unité. La première idée qui venait à l'esprit était de considérer cette forme comme étant exacte à un exposant près, la remenant ainsi au schéma général ($\text{C}_{14,59} \text{H}_{10,42} \text{N}_{3,45} \text{O}$) n ; or, la cryoscopie montre que (n) ne peut être supérieur à l'unité. Si de tels résultats ne sont pas imputables à des erreurs expérimentales (quatre dosages de carbone et d'hydrogène ayant donné des chiffres concordants), on ne peut guère

songer à les interpréter, à moins que la substance analysée ne renferme plus d'une espèce chimique.

Il résulte de ce que je viens d'exposer que nous n'avons plus le choix qu'entre les schémas (1) et (2).

Chloroplatinate. — C'est au chloroplatinate que nous nous adresserons pour décider entre les formules (1) et (2). A cet effet, on prépare une solution d'oxychlororaphine dans l'acétone acidulée par HCl à laquelle on ajoute une solution cétonique de chlorure de platine. On obtient instantanément un précipité jaune cristallin. On essore, on lave les cristaux à l'acétone, et on purifie par deux nouvelles cristallisations dans l'alcool. On obtient une poudre rouge brun cristallisée sous forme de prismes. Le chloroplatinate ainsi obtenu ne présente pas de point de fusion net. Projeté dans l'eau, il se décompose; sa composition semble varier quelque peu avec les conditions de cristallisation et, malgré toutes les précautions habituelles, les résultats d'analyses restent peu satisfaisants.

Dosage du platine :

0^{gr},1580 de substance ont donné 0^{gr},0369 de Pt.

Dosage du chlore :

0^{gr},2518 de substance ont donné 0^{gr},246 de AgCl (1).

	Calculé pour : (C ₁₄ H ₁₁ N ₄ OHCl) ₂ Pt Cl ₄	Calculé pour : (C ₁₁ H ₁₀ N ₃ OHCl) ₂ Pt Cl ₄	Trouvé
Pt, pour cent.	20,81	22,09	23,35
Cl, pour cent.	22,73	24,12	24,15

Le peu de concordance entre le poids de platine trouvé et celui calculé d'après le schéma (C₁₄ H₁₀ N₃ O HCl)₂ Pt Cl₄ rend difficile le choix de la formule; néanmoins, il semble bien que c'est au schéma C₁₄ H₁₀ N₃ O qu'il faut accorder la préférence, puisqu'il fournit les chiffres les plus rapprochés de ceux donnés par l'expérience.

(1) Ce dosage est un peu incertain. En effet, le chlore est dosé par la méthode à la chaux et, comme la substance est assez riche en N, il a pu se former un peu de cyanure d'argent.

Propriétés chimiques. — Il semble résulter des propriétés examinées que l'oxychlororaphine possède une fonction basique; cependant, je n'ai pas pu obtenir de sulfate, ni de chlorhydrate d'oxychlororaphine; d'autre part, en essayant de déterminer la quantité d'acide nécessaire pour saturer un poids connu de substance, j'ai obtenu les résultats suivants :

0gr,2954 de substance dissous dans 300cm³ d'acétone additionnés de 40cm³ HCl N/5 exigent 40cm³,3 de Na OH correspondante à l'acide, pour être neutralisés.

Témoin : 300cm³ d'acétone additionnés de 40cm³ HCl N/5 exigent 40cm³,2 de Na OH correspondante pour être neutralisés.

Il ne paraît donc pas certain que l'oxychlororaphine possède une fonction basique.

Action du chlore et du brome (1). — Lorsqu'on fait passer un courant de chlore dans des solutions aqueuses ou chlorhydriques d'oxychlororaphine, on obtient un précipité blanc cristallin, soluble en jaune dans l'ammoniaque. De même, le brome précipite l'oxychlororaphine de ses solutions aqueuses sous forme de belles aiguilles jaunes.

Action de la potasse. — La potasse ajoutée en excès aux solutions d'oxychlororaphine précipite de grandes aiguilles jaune-verdâtre ou de longs filaments flexueux.

Lorsqu'au contraire on superpose une solution cétonique d'oxychlororaphine et une dissolution aqueuse saturée de potasse, on observe après un certain temps, partant du plan de contact des deux liquides, la formation d'un corps coloré qui diffuse bientôt dans toute la masse cétonique, celle-ci se colore successivement en bleu clair, bleu foncé, violet, orange, et enfin en jaune.

Chauffée en présence de potasse et d'eau, l'oxychlororaphine dégage de l'ammoniaque. L'azote dégagé peut atteindre 13,91 %, alors que la matière en renferme 19,4 %.

(1) Comme, pour effectuer toutes les réactions qui vont suivre, je ne disposais que d'une faible quantité de substance, je ne pouvais songer à vouloir déterminer la nature des produits obtenus avec tel ou tel agent; les réactifs qui déterminent, dans la substance, un changement visible à l'œil, seront donc seuls étudiés.

Oxydation. — Les solutions acides d'oxychlororaphine abandonnées à l'air ne tardent pas à être le siège de phénomènes nouveaux. C'est ainsi qu'une solution chlorhydrique, abandonnée en vase ouvert à la température du laboratoire, présente, au bout de cinq jours, une teinte rouge et un précipité rouge-brun constitué par de petites sphères brunes. Chaque sphère est elle-même formée d'une infinité d'aiguilles. Dans le même temps et dans les mêmes conditions d'aération et de température, une solution azotique (additionnée de quelques gouttes d'HCl) donne un dépôt cristallin rouge brique et de petits cristaux jaunes flottant dans la solution. Le premier précipité est constitué par des sphères brunes et le second par des cristaux cunéiformes extrêmement réguliers.

Suivant les conditions d'oxydation, on obtient soit une teinte rouge clair des solutions et un précipité cristallin, soit seulement la coloration rouge foncé des liqueurs. Dans ce dernier cas, le traitement de la solution par le chloroforme montre que l'on peut séparer une liqueur chloroformique jaune, souvent fluorescente, dont la coloration augmente avec le temps et une liqueur acide rouge vineux qui devient de plus en plus violacée.

L'eau oxygénée, le perborate de soude, l'acide nitreux, le bichromate de soude, le permanganate de potasse, la mousse de platine, ne déterminent aucune coloration nouvelle de la substance jaune.

Réduction. — Lorsqu'on traite une solution aqueuse d'oxychlororaphine par Zn et HCl, on observe le verdissement de la liqueur. Mais, si la réduction se prolonge, la solution devient successivement verte, jaune verdâtre, jaune d'or et incolore. De la teinte jaune verdâtre, on peut revenir au vert par H_2O_2 , mais à partir de la nuance jaune d'or, les oxydants ne le permettent plus.

Avec les solutions cétoniques, on observe une succession de teintes analogues. Le fer et HCl, le fer et l'acide acétique, donnent les mêmes résultats que Zn et HCl.

La poudre de zinc en présence d'eau et à 100° durant quelques secondes, le fer et le zinc en présence de sulfate d'ammoniaque

et d'eau, déterminent la précipitation de cristaux verts qui paraissent semblables à ceux de chlororaphine.

Lorsque l'on fait passer un courant d'hydrogène dans des solutions d'oxychlororaphine, on n'observe aucun verdissement de la liqueur. Il n'en est plus de même lorsqu'on chauffe la substance jusqu'à sa température de fusion dans une atmosphère d'hydrogène, on obtient alors par sublimation de beaux cristaux verts.

L'acide sulfhydrique produit à chaud, dans les solutions aqueuses, un précipité cristallin vert; dans les solutions cétoniques, il colore seulement la liqueur en jaune d'or, mais l'évaporation, à l'abri de l'air, de la dissolution donne de beaux cristaux verts. Le sulfhydrate d'ammoniaque se comporte comme l'acide sulfhydrique.

Réactifs généraux précipitants des alcaloïdes. — J'ai consigné dans le tableau ci-dessous quelques-uns des résultats obtenus avec les réactifs des alcaloïdes.

DÉSIGNATION DU RÉACTIF	OXYCHLORORAPHINE EN SOLUTION	
	aqueuse	cétonique
Acide phosphomolybdique	Pp. (1) jaune serin amorphe	
Acide métatungstique	Pp. jaune serin amorphe	
Tanin	Pp. jaune serin amorphe	
Iodure double de bismuth et de potassium	Pp. rouge brique amorphe	"
Acide picrique	Rien	Pp. jaune cristallin
Bichlorure de mercure	{ Pp. blanc cristallin, grandes aiguilles groupées en rosaces	"
Bromure de potassium bromé	{ Pp. blanc cristallin, aiguilles	"
Chlorure d'or	{ Pp. orangé, grandes aiguilles jaune brun (précipitation s'effectue après quelques minutes).	Précipitation instantanée
Chlorure de platine	{ Rien	Pp. cristallin instantané (V. chloroplatinate)

(1) Pp. signifie précipité.

S'il est impossible d'obtenir le chloroplatinate en utilisant les solutions aqueuses, on obtiendra néanmoins ce sel en partant de la solution chlorhydrique de la substance. Ces liqueurs sont, en effet, plus concentrées que les dissolutions aqueuses.

Enfin, les réactifs colorants des alcaloïdes donnent, avec l'oxychlororaphine, des colorations variant du jaune au rouge grenadine.

Spectre. — Les solutions cétoniques ou acides d'oxychlororaphine, les solutions réduites et vertes, ne présentent pas de bandes d'absorption caractéristiques. On constate seulement l'extinction du spectre dans la région la plus réfrangible.

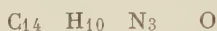
Action physiologique. — L'oxychlororaphine, soit par ingestion, soit par introduction dans la cavité abdominale à la dose de 1 à 12 milligrammes, ne paraît pas déterminer de troubles appréciables chez le Cobaye et la Souris. Sa faible solubilité dans l'eau rend difficile l'introduction dans l'organisme de doses suffisantes pour mettre en parallèle son action avec celle de certains pigments d'origine animale, la bilirubine par exemple, qui tue aux doses de 0,05 à 0,1 par kilog. d'animal. Les résultats signalés plus haut sont comparables à ceux qui ont été obtenus avec la pyocyanine. GESSARD (1882) a, en effet, injecté sans succès une faible quantité de pyocyanine à un oiseau, et LEGROS (1900), opérant avec des doses de 5 milligrammes, n'a pu déterminer aucun trouble sensible chez le Cobaye.

RÉSUMÉ

Chlororaphine. — La chlororaphine cristallise dans les milieux de culture sous forme d'aiguilles vertes groupées en rosaces, en faisceaux. Elle se sublime vers 240° et donne des cristaux verts dans une atmosphère de gaz inerte, et des cristaux d'oxychlororaphine en présence d'oxygène. Elle fond vers 225°, sans point de fusion net. Elle est insoluble dans l'eau et la plupart des solvants neutres. Elle se dissout dans l'acétone, l'aniline et les acides. Par contre, elle est insoluble dans les alcalis concentrés. Abandonnée à l'air, elle absorbe l'oxygène et se transforme en oxychlororaphine. L'oxydation est activée par la chaleur; ses solutions sont très oxydables, d'où la nécessité d'effectuer la purification des cristaux verts à l'abri de l'air.

Dissoute à chaud dans l'acétone, elle laisse déposer, par refroidissement, des cristaux jaunes d'oxychlororaphine que l'on purifie par des cristallisations successives.

Oxychlororaphine. - L'oxychlororaphine se sublime facilement et fond à 236°₈ (F. c.). Elle est faiblement soluble ou insoluble dans les solvants neutres, très soluble dans les acides concentrés, mais les alcalis concentrés ne peuvent la dissoudre. Les cristaux jaunes répondent vraisemblablement à la formule suivante :



L'oxychlororaphine forme des sels doubles avec le chlorure de platine $(\text{C}_{14} \text{H}_{10} \text{N}_3 \text{O} \text{HCl})_2 \text{Pt Cl}_4$ et le chlorure d'or; mais il n'a pas été possible d'obtenir de chlorhydrate ou de sulfate. La potasse à froid et dans des conditions spéciales détermine l'apparition d'un chromogène passant du bleu à l'orange à mesure que la réaction se continue. L'oxychlororaphine, chauffée en présence de potasse et d'eau, dégage de l'ammoniaque. Fondue avec l'oxyde de potassium, elle donne naissance à un produit cristallin brun, soluble dans l'eau. L'oxydation par l'air des solutions de substance jaune permet d'isoler de nouveaux chromogènes (violet, jaune fluorescent, jaune, rouge brun). La réduction en liqueur acide de l'oxychlororaphine donne de belles solutions vertes; en milieu neutre ou légèrement alcalin, il y a précipitation de cristaux verts. Les solutions de substance jaune précipitent par tous les réactifs des alcaloïdes. Le spectre des diverses solutions d'oxychlororaphine ne présente pas de bandes d'absorption caractéristiques. Enfin, cette substance paraît dénuée de propriétés toxiques.

TROISIÈME PARTIE

PATHOLOGIE

De nombreuses observations ont déjà montré le pouvoir pathogène pour l'homme et les animaux de plusieurs bacilles fluorescents parmi lesquels je citerai *B. pyocyaneus* (GESSARD (1882), CHARRIN (1891), *B. de la diarrhée verte des enfants du premier âge*, de LESAGE (1888), *B. fluorescent non liquéfiant*, de LEPIERRE (1895), *B. fluorescent liquéfiant* de DUCAMP et PLANCHON (1894), *B. fluorescent* de ROCHA, LEPIERRE et FONSECA (1900), etc. D'autres auteurs ont constaté la présence de bacilles fluorescents dans les cavités naturelles de l'homme et des animaux.

Enfin, KÖPLIK, JIROU et ÉTIENNE (1899) ont décrit chez l'homme certaines infections dues à des bactéries fluorescentes. Il est donc intéressant de vérifier si *B. chlororaphis*, qui n'a jusqu'ici provoqué aucune affection morbide nosologiquement classée, ne peut pas, sous certaines conditions, s'implanter dans des organismes vivants et y déterminer des troubles profonds ou même mortels.

Dans ce but, j'ai inoculé diverses cultures de *B. chlororaphis* à des Souris, Cobayes, Grenouilles, Poissons, Écrevisses, et ce sont les résultats de ces expérimentations que je vais résumer maintenant.

Les cultures de *B. chlororaphis* sont pathogènes pour la Souris, le Cobaye, la Grenouille, divers Poissons et l'Écrevisse.

La Souris et, plus particulièrement, les Poissons, paraissent être les animaux les plus favorables à l'expérimentation.

L'infection par ingestion a toujours donné des résultats négatifs avec la Souris et le Cobaye, tandis que l'inoculation intrapéritonéale ou sous-cutanée déterminent la mort plus ou moins rapide de l'animal inoculé, lorsqu'on opère avec des cultures convenablement choisies. En effet, nous verrons que la virulence de *B. chlororaphis* varie avec les échantillons considérés.

Étant données les animaux expérimentés, je classerai les tentatives d'infection en deux catégories :

1^o Inoculation d'animaux à température constante (Souris, Cobaye).

2^o Inoculation d'animaux à température variable (Batraciens, Poissons, Arthropodes).

1^o INOCULATION A CERTAINS ANIMAUX A TEMPÉRATURE CONSTANTE

INOCULATION A LA SOURIS

Je vais d'abord étudier l'action de *B. chlororaphis* sur les animaux du premier groupe. Et parmi ceux-ci je commencerai par la Souris, cet animal étant le plus sensible au Microorganisme de GUIGNARD et SAUVAGEAU.

Inoculation à la Souris } I. Étude générale sur l'Inoculation.
 } II. Variation expérimentale du pouvoir chromogène.

1. Étude générale sur l'inoculation. — L'inoculation intrapéritonéale ou sous-cutanée tue la Souris parfois en deux à quatre heures, d'autres fois en sept à vingt-quatre heures, mais plus rarement la survie se prolonge jusqu'au douzième jour.

L'affection peut donc évoluer d'une façon aiguë ou suraiguë suivant la qualité et la quantité du virus introduit dans l'organisme et suivant le degré de réceptivité de l'animal. Dans les formes les moins rapides, les principaux symptômes sont l'abat-

tement, l'inappétence, la somnolence et parfois, à la fin, des convulsions.

L'autopsie ne montre généralement pas de lésions caractéristiques, cependant, on peut observer, dans le cas d'inoculation intrapéritonéale, un épanchement péritonéal, plus rarement des exsudats pleural et péricardique. Enfin, très rarement, le foie est décoloré.

Quelles que soient les lésions observées, le bacille s'est généralisé à tout l'organisme, on le retrouve plus ou moins abondamment dans le foie, la rate, les reins, et l'ensemencement du sang du cœur donne des cultures de *B. chlororaphis* pures.

La dose mortelle varie avec les échantillons injectés ainsi que l'atteste l'expérience suivante :

DÉSIGNATION des cultures injectées	MODE d'inoculation	QUANTITÉ DE CULTURE INOCULÉE	NOMBRE DE SOURIS INOCULÉES	SUITES DE L'INOCULATION
A	intrapéritonéale.	0cc.5	4	La mort survient de 16 à 24 heures après l'inoculation.
	sous-cutanée . .	0.5	4	La mort survient de 15 à 21 heures après l'inoculation.
B	intrapéritonéale.	0.5	4	Trouble passager, guérissent rapidement.
	—	1	4	La mort survient de 18 à 24 heures après l'inoculation.
C	intrapéritonéale.	1	4	Trouble passager, guérissent.
	—	2	4	La mort survient de la 12 ^e heure au 4 ^e jour après l'inoculation

Nous voyons donc que toutes les cultures de *B. chlororaphis* ne sont pas également virulentes. Par contre, les modes d'inoculations intrapéritonéales ou sous-cutanées donnent sensiblement les mêmes résultats.

La virulence varie non seulement avec les échantillons considérés, mais encore avec l'âge de la culture. On le démontre aisément en opérant de la façon suivante : à l'aide d'un dispositif spécial, on prélève 20 centimètres cubes d'une culture de

vingt-quatre heures; la prise effectuée, la culture est remise à l'étuve. Le liquide prélevé sert à inoculer (un centimètre cube en inoculation intrapéritonéale) un lot de quatorze Souris. Des animaux ainsi traités, quatre survivent, les autres meurent respectivement après trois, quatre, cinq, six, sept, huit, dix jours. Neuf jours après le prélèvement des 20 centimètres cubes, on inocule, avec la culture, alors âgée de dix jours, neuf Souris (injection intrapéritonéale de 1 centimètre cube) et les animaux meurent respectivement après 2^h 45, 3 heures, 4 heures, 4^h 30, 5 heures, 6^h 15, 7 heures et 7^h 15.

Ce fait s'expliquera aisément lorsque nous aurons montré, dans les cultures âgées, l'existence de produits toxiques solubles.

D'autre part, les résultats d'inoculation varient avec les individus expérimentés et, en inoculant un assez grand nombre de Souris, il n'est pas rare de rencontrer des individus qui résistent à des doses doubles de celles qui sont mortelles pour la majorité des Souris.

Enfin, le dernier facteur qui intervient dans l'expérimentation du pouvoir pathogène de *B. chlororaphis*, c'est la température du local où les Souris sont logées. A une température de 25°, les Souris succombent à une dose de virus beaucoup plus faible qu'à 17°.

Malgré toutes les causes qui influencent la virulence de *B. chlororaphis*, on peut admettre qu'en général une culture de huit jours, présentant de nombreux cristaux, est mortelle pour la Souris à la dose de 1 centimètre cube (inoculation intrapéritonéale). La mort survient de la quatrième à la vingt-quatrième heure après l'injection. A la dose de 0^{cm3}.8, la moitié des animaux inoculés résistent, pour l'autre moitié, la mort survient de la quatrième à la vingt-quatrième heure après l'inoculation.

Ces conclusions s'appuient sur les observations fournies par soixante-dix inoculations intrapéritonéales ou sous-cutanées.

En utilisant des semences qui ne tuent qu'au centimètre cube, on peut, par passages sur Souris, obtenir aisément des cultures mortelles au demi-centimètre cube.

Agglutinines. — Enfin, trois Souris, qui ont reçu chacune

successivement $0^{\text{cm}^3},4$; $0^{\text{cm}^3},5$; $0^{\text{cm}^3},8$; 1 centimètre cube; $1^{\text{cm}^3},3$; $1^{\text{cm}^3},5$ de culture de vingt-quatre heures, fournissent du sérum qui agglutine à 1% *B. chlororaphis*.

II. **Variation expérimentale du pouvoir chromogène.** — Au cours des différentes manipulations destinées à renforcer la virulence d'une semence donnée, on constate que *B. chlororaphis*, après un seul passage par l'organisme souris, présente la faculté de donner de la chlororaphine à 37°. C'est là un exemple de variation expérimentale que j'ai cru devoir étudier (en collaboration avec L. MERCIER (1911), car, durant ces dernières années, la « *variation* » dans le domaine de la bactériologie a été l'objet de nombreuses recherches. En effet, si RODET (1894) croyait pouvoir admettre que les tentatives faites jusqu'à cette époque pour obtenir une « *transformation spécifique* » de types bactériens n'avaient donné que des résultats bien imparfaits, des bactériologistes, parmi lesquels nous citerons BARBER (1907), MASSINI (1907), BURK (1908), JAGER (1908), KOWALENKO (1910), ont démontré l'existence, chez les Bactéries, de *mutations* au sens de DE VRIES.

Or, il nous semble, étant donnée la difficulté d'expérimenter en partant d'une seule cellule bactérienne, que ce n'est qu'avec une grande prudence que l'on doit appliquer le mot de « *mutations* » aux variations morphologiques et physiologiques signalées par certains auteurs; car des cultures obtenues en partant d'une colonie isolée sur plaque peuvent renfermer une population hétérogène formée d'éléments préadaptés à certaines conditions d'existence; de sorte que, dans certains cas, la mutation aurait pu être antérieure à l'expérience qui la rend objective, cette expérience n'étant, en quelque sorte, que le réactif qui met les mutants en évidence.

Les observations que nous avons faites sur *B. chlororaphis* montrent la valeur qu'il convient d'attribuer à cette restriction.

1. **Exposé des faits.** — **EXPÉRIENCE α .** — *Bacillus chlororaphis*, avons-nous vu, est caractérisé par la production de chlororaphine; il produit cette substance d'une façon constante à la température de 25-30° C.

lorsqu'il se trouve dans des conditions convenables de culture (Voir p. 56), mais la fonction chromogène paraît ne pas se produire à 37°. En effet, si onensemence vingt ballons, par exemple, et que l'on place dix de ces ballons à 25° et dix à 37°, on constate que les ballons du premier groupe donnent tous de la chlororaphine, tandis que cette substance fait défaut dans les cultures du second lot.

Cependant, si l'onensemence, en partant chaque fois d'une culture provenant d'une seule colonie, des séries de cent ballons et plus qui sont placés à 37°, on observe, dans chacune de ces différentes séries, un certain nombre de cultures chromogènes. A titre de documentation, j'indique les résultats extrêmes :

Série A : 150 ballonsensemencés, un seul donne de la chlororaphine.

Série B : 100 ballonsensemencés, sept donnent de la chlororaphine.

Le pouvoir chromogène de la semence qui a servi aux expériences a été contrôlé à chaque essai sur vingt-cinq ballons placés à 25°. Tous, sans exception, ont donné des cristaux.

EXPÉRIENCE β . — Ces expériences montrent que, pour obtenir une culture chromogène à 37°, il faut opérer sur un nombre considérable de ballons; aussi, avons-nous cherché à obtenir, d'une façon relativement constante, la production de la chlororaphine à cette température. A cet effet, nous avons fait passer *B. chlororaphis* par l'organisme de la Souris. Des Souris sont inoculées avec des doses de 1^{cm}³,5; elles sont sacrifiées lorsque les premiers symptômes de l'agonie apparaissent. Le sang du cœur, prélevé aseptiquement, sert à l'ensemencement d'un certain nombre de ballons qui sont placés à 37°. Dans une première expérience, sur 14 ballonsensemencés, 3 restent stériles, 11 cultivent et, parmi ceux-ci, 9 donnent de la chlororaphine (sur 100 ballonsensemencés avec la culture ayant servi à faire l'inoculation et placés à 37°, un seul a donné des cristaux). Une seconde expérience a donné les résultats suivants : sur 30 ballonsensemencés, 5 restent stériles, 25 cultivent, parmi lesquels 22 donnent de la chlororaphine (l'expérience comparative a donné 7 ballons à cristaux sur 100; voir série B de l'expérience α).

D'après les résultats fournis par ces expériences, on voit que le passage de *B. chlororaphis* dans la Souris augmente de beaucoup la proportion du nombre des cultures donnant des cristaux à 37°.

De plus, les cultures obtenues par ensemencement avec le sang de Souris conservent la propriété de donner de la chlororaphine à 37°, ainsi que nous avons pu nous en assurer par une série de quinze repiquages en milieux appropriés. *La modification est donc devenue permanente.*

2. Hypothèses que suggèrent ces deux séries d'expériences. —

Faisant abstraction des indications fournies par l'expérience α , on pourrait être tenté d'admettre que le passage d'une culture par l'organisme souris a déterminé l'apparition brusque d'une race chromogène à 37°, c'est-à-dire d'une mutation au sens de DE VRIES.

Mais nous savons, d'après les résultats fournis par l'expérience α , qu'une culture provenant d'une seule colonie renferme quelques éléments capables de donner de la chlororaphine à 37°; dès lors, une seconde hypothèse s'impose à l'esprit, et cela d'autant plus qu'elle s'appuie sur une observation faite par HANSEN (1905).

Ce savant, étudiant différents types de levures dont *Saccharomyces validus* (= *S. Pastorianus III*), espèce bien connue comme levure haute typique, a constaté, dans les cultures de cette levure, la présence de quelques éléments du type de fermentation basse dans la proportion de 3% environ. Il en conclut que les levures hautes et basses ne sont pas des espèces indépendantes, mais peuvent se développer simultanément et inégalement dans des cultures que l'on pourrait supposer homogènes d'après le résultat global de la fermentation produite, et que l'une des deux formes peut supplanter l'autre suivant les conditions de culture.

De même, nous pouvons admettre qu'en inoculant une certaine dose d'une culture de *B. chlororaphis* l'organisme souris agit sur la population hétérogène inoculée pour sélectionner des éléments *préadaptés* qui, entre autres propriétés, ont celle de donner de la chlororaphine à 37°. Le mécanisme de cette sélection pouvant être ramené au schéma général suivant : soit une population *P* qui est un mélange de deux biotypes *A* et *B*. Au biotype *A* appartient la plus grande partie de *P*. Considérons un milieu *M* dans lequel *A* ne puisse se développer que très difficilement, mais où, au contraire, *B* rencontre des conditions de vie facile. Que se passera-t-il lorsqu'on transportera *P* dans le milieu *M*? Le biotype *B*, qui avait passé presque ou même inaperçu en *P*, va se développer énergiquement et devenir dominant en nombre, en sorte que la nouvelle population *P'*,

que l'on obtiendra ainsi, différera par son ensemble de *P* qui lui a donné naissance. Il y aura eu *filtrage des formes préadaptées*, au sens de DE VRIES, de DAVENPORT (1903), de MORGAN (1903), de CUÉNOT (1909, 1911).

Peut-on admettre l'existence d'un phénomène de ce genre en ce qui concerne *B. chlororaphis*? Étant donnés les faits dont nous disposons jusqu'à présent, il est difficile de se prononcer sur la valeur des deux hypothèses que nous avons émises. Il est évident que l'existence de quelques cultures chromogènes à 37°, sans avoir passé par l'organisme souris, donne quelque créance à l'hypothèse d'un filtrage; mais doit-on rejeter toute idée d'une variation lente ou brusque (mutation au sens de DE VRIES)? C'est là une question à laquelle il ne sera possible de répondre qu'après de nouvelles expériences.

Conclusions. — Quelles que soient les hypothèses, nous croyons pouvoir dire, quant à présent, qu'une colonie de *B. chlororaphis*, isolée sur gélose, renferme au moins deux sortes d'éléments: les uns susceptibles de donner de la chlororaphine à 25-30° et ne présentant pas cette propriété à 37°; les autres, très peu nombreux, produisant des cristaux à 37°. De plus, le passage d'une culture, obtenue en partant de cette colonie, par l'organisme souris, augmente dans de très fortes proportions le nombre des éléments chromogènes à 37°.

INOCULATION AU COBAYE

Avec le Cobaye, les résultats obtenus sont bien plus inconstants encore qu'avec la Souris où nous avons cependant déjà vu le pouvoir pathogène varier avec la nature et l'âge de la culture. Le Cobaye ne saurait donc constituer un réactif de choix.

Le mode d'infection préférable est l'inoculation intrapéritonéale. L'injection, dans le péritoine du Cobaye, d'une culture de vingt-quatre heures a une action variable avec les souches considérées, ainsi qu'il résulte des expériences suivantes :

1° Cinq Cobayes (pesant chacun de 220 à 310 grammes) reçoivent 2 à 5 cm³ de culture *A* de vingt-quatre heures. Les animaux ne présentent

qu'un trouble passager; l'inappétence dure un à deux jours et on n'observe pas de variations sensibles de la température.

Un mois après l'inoculation, la pesée accuse une augmentation de poids chez deux d'entre eux. Puis les animaux étant sacrifiés, l'autopsie montre le foie de volume normal, mais présentant un piqueté blanchâtre à sa surface. Certains individus offrent, en outre, des kystes de la grosseur d'un petit pois. Les ganglions mésentériques sont parfois hypertrophiés. Mais la mise en culture des différents viscères n'a pas permis l'isolement de *B. chlororaphis*.

2° Quatre cobayes (de 400 à 600 grammes) sont inoculés dans le péritoine (6cm³ d'une culture *B* de vingt-quatre heures). La mort survient du huitième au quinzième jour. Elle ne paraît pas avoir été précédée d'aucun symptôme; seul, l'amaigrissement est constant. L'autopsie ne montre aucune lésion caractéristique.

Les cultures de vingt-quatre heures sont donc, en général, peu virulentes. LÉVY et GRANSTRÖM-WOSKOBOINIKOW (1908) ayant montré que des cultures de vingt-quatre heures de *B. pyocyaneus* pouvaient après filtration jouer le rôle d'agressines, j'ai cherché si celles de *B. chlororaphis* présentaient des propriétés analogues; mais les essais effectués ne furent pas concordants et ne permettent de tirer aucune conclusion.

Toxines solubles. — Nous avons remarqué, à propos des Souris, que la virulence des cultures augmente avec l'âge. Il en est de même dans l'expérimentation sur le Cobaye. Ainsi, cinq Cobayes (de 4 à 500 grammes), qui ont reçu 2 centimètres cubes d'une culture âgée de quinze jours, en injection intrapéritonéale, meurent de la douzième à la vingt-quatrième heure après l'inoculation, et l'autopsie montre un exsudat péritonéal roussâtre très abondant.

Cette augmentation de la virulence avec l'âge de la culture nous conduit à la recherche des toxines solubles dans les milieux où se développe *B. chlororaphis*. Je prends ici le terme de *toxine* dans le sens le plus large « *appliquant cette dénomination à toutes les substances chimiques qui, formées au cours des fermentations microbiennes, sont susceptibles d'influencer l'organisme à titre d'agents toxiques ou phlogogènes, quel que soit, d'ailleurs, le mécanisme de leur action* » (Hugounenq [1896]).

Pour mettre en évidence les toxines solubles, des cultures âgées de dix à vingt jours sont filtrées, soit sur bougie Chamberland (*F*), soit sur bougie Nordmeyer-Berkefeld. Le filtrat est fractionné; certaines portions sont chauffées, d'autres sont soumises à des précipitations par l'alcool. Dans ce dernier cas, on obtient un précipité floconneux qui, après centrifugation et essorage rapide, est redissous dans l'eau physiologique.

En inoculant respectivement les animaux avec de la solution filtrée non chauffée, du filtrat chauffé à 100° pendant cinq minutes et de la solution physiologique, je suis arrivé aux résultats suivants :

1° Quatre Cobayes (de 0kg,400 à 0kg,500) reçoivent en injection intrapéritonéale 5 centimètres cubes de filtrat non chauffé. La mort survient respectivement après 6-8-10-18 heures.

2° Trois Cobayes (de 0kg,400 à 0kg,500) reçoivent 5 centimètres cubes de filtrat chauffé. Un animal meurt le dixième jour et l'autopsie montre la congestion des poumons. Les deux autres Cobayes ne paraissent pas réagir à l'inoculation.

3° Deux Cobayes (0kg,300 à 0kg,400) reçoivent 5 centimètres cubes de solution physiologique. Les animaux ne présentent aucun symptôme de maladie.

Il résulte donc de ces expériences que *B. chlororaphis* sécrète des *produits toxiques solubles*. Il semble aussi que le chauffage les détruit, mais cela n'implique nullement qu'ils soient de nature albumosique. En effet, nous savons que la xanthoraphine, tout en présentant les caractères des alcaloïdes, est cependant décomposée à 100°.

Agglutinines. — On pouvait espérer, par des inoculations progressives et répétées de jeunes cultures, faire apparaître dans l'organisme du Cobaye des anticorps spécifiques et en particulier des agglutinines.

Par suite d'accidents survenus aux animaux (quinze cobayes) mis en expérience, je n'ai pu jusqu'à présent obtenir des sérums agglutinant à plus de 1 de sérum pour 200 de culture.

2° INOCULATION A CERTAINS ANIMAUX D'EAU DOUCE

Nous venons de voir que *B. chlororaphis* peut, dans certaines conditions, déterminer des troubles mortels chez le Cobaye et la Souris. Et, comme d'autre part, à une exception près (type de GUIGNARD et SAUVAGEAU) ce bacille a toujours été isolé d'eaux de puits, de sources ou de rivières, il m'a paru intéressant de rechercher s'il était pathogène pour des animaux d'eau douce. A cet effet, j'ai (en collaboration avec L. MERCIER (1911)) inoculé des doses variables de cultures de *B. chlororaphis* à des Écrevisses, à des Poissons et à des Grenouilles.

INOCULATION A L'ÉCREVISSE (*Astacus fluviatilis* Fabr. = *Potamobius astacus* L.)

Des Écrevisses saines (les témoins n'ont pas donné de mortalité) reçoivent des doses faibles ($0^{cm^3}, 2$) d'une culture de quarante-huit heures (température de l'eau 9°). Quelques heures après l'inoculation, les Crustacés se montrent agités, ils ne fuient plus la lumière; à cette première période en succède une seconde durant laquelle ils perdent progressivement de leur agilité et présentent de la contraction des muscles des pattes. Finalement, la mort survient entre vingt-quatre et quarante-huit heures. Ces symptômes, peu caractéristiques, sont différents de ceux de la peste des Écrevisses dont l'agent est, comme on le sait, *Bacillus pestis astaci* Hofer.

INOCULATION AUX POISSONS

Bacillus chlororaphis s'est montré pathogène pour toutes les espèces de Poissons d'eau douce auxquelles nous l'avons inoculé : Carpe (*Cyprinus carpio* L.), Tanche (*Tinca tinca* L.), Brème (*Abramis brama* L.), Gardon (*Leuciscus cutilus* L.), Perche (*Perca fluviatilis* L.).

Les inoculations ont été faites, soit dans la cavité du corps, soit dans la masse musculaire dorsale; nous noterons tout de suite qu'à dose égale la mort est moins rapide dans le cas d'une injection intramusculaire.

Une injection dans la cavité du corps d'une dose de $0^{\text{cm}^3},5$ d'une culture de quatre jours tue les Poissons entre vingt-quatre et quarante-huit heures; les animaux meurent sans présenter de lésion constante et caractéristique. Nous noterons que, quelques heures après l'inoculation, les Poissons sont moins vifs, la région caudale paraît paralysée; dans quelques cas, nous avons constaté les traces d'une hémorragie branchiale.

De tous les Poissons sur lesquels nous avons expérimenté, c'est le Gardon qui s'est montré le plus sensible. Or, tandis que des Gardons sont tués en vingt-quatre heures par une injection de $0^{\text{cm}^3},5$ d'une culture de cinq jours, la même dose d'une culture de vingt-quatre heures ne tue qu'en cinq à dix jours des animaux de même poids (170 à 180 grammes). Par conséquent, à doses égales, la mort est d'autant plus rapide que la culture inoculée est plus âgée.

Je rappellerai que nous sommes arrivé aux mêmes conclusions dans l'expérimentation sur Souris et sur Cobaye, et que ces conclusions nous ont conduit à la recherche de toxines solubles dans les cultures de *B. chlororaphis*.

Nous allons donc répéter, avec les Poissons, l'expérience faite sur la Souris et le Cobaye. A cet effet, de vieilles cultures sont filtrées sur bougie Chamberland (*F*), ou Nordtmeyer-Berkefeld. Le filtrat inoculé à des Gardons, à des doses variant entre $0^{\text{cm}^3},5$ et 1^{cm^3} , détermine la mort entre un et cinq jours. Les cultures filtrées renferment donc des substances toxiques pour les Poissons.

INOCULATION A LA GRENOUILLE

(*Rana temporaria* L.)

Des Grenouilles sont tuées en vingt-quatre heures par une injection intracavitaire d'une dose de $0^{\text{cm}^3},5$ d'une culture de trente-six heures et en quarante-huit heures par une injection

d'une dose de 1 cm^3 de la même culture dans le sac lymphatique dorsal.

Pour établir d'une façon complète le pouvoir pathogène de *B. chlororaphis*, il resterait à réaliser l'infection par la voie digestive. Il serait intéressant également de maintenir des Poissons et des Écrevisses avec certains de leurs ectoparasites (*Argulus foliaceus*, *Piscicola*, *Branchiobdella*) dans une eau contaminée, et de voir si les plaies causées par ces parasites peuvent servir de porte d'entrée au bacille.

On connaît de nombreux bacilles pathogènes pour les animaux d'eau douce. Mais, pour beaucoup de ces bacilles, nos connaissances sont encore très incomplètes, ainsi que l'on peut s'en rendre compte en consultant des ouvrages spéciaux tels que ceux du professeur HOFFER (1904), et de DE DROUIN DE BOUVILLE (1908); aussi est-il très difficile de rapprocher *B. chlororaphis* de l'un d'eux. C'est ainsi, par exemple, que *B. chlororaphis* présente des caractères morphologiques et culturels communs avec le Bacille de la « peste des eaux douces » de BATAILLON et DUBARD (1893-1894), avec le Bacille de A. CHARRIN (1893), avec le Bacille de BABÈS et RIEGLER (1903), avec *B. hydrophilus fuscus* de SANARELLI (1891-1893), et avec *B. ranicida* de P. ERNST. Comme ces Bacilles il est mobile, liquéfie la gélatine, peut donner une culture jaune brunâtre sur pomme de terre. Comme le Bacille de BABÈS et RIEGLER, il ne prend pas le Gram; comme lui, il est très polymorphe.

Ces quelques exemples que je viens de citer prouvent suffisamment que *B. chlororaphis* a des caractères communs avec d'autres bacilles déjà connus et qui sont pathogènes pour les Poissons. Pour le moment, il est donc difficile de voir en *B. chlororaphis* une individualité nouvelle, cause de maladies pour les Poissons. Car si le caractère de la production de la chlororaphine a été négligé, il est de toute évidence qu'un auteur s'étant contenté d'une étude relativement sommaire a pu très bien isoler une forme de bacille qui n'était autre que *B. chlororaphis*.

Maintenant que l'on sait que le Bacille de GUIGNARD et SAUVAGEAU est pathogène pour les Poissons, que l'on peut d'autre

part réaliser un milieu de culture permettant une formation rapide et constante de chlororaphine, je pense qu'il sera possible à l'avenir d'identifier, à l'occasion, un bacille pathogène pour les Poissons avec *B. chlororaphis* et de définir ainsi le rôle que joue ce dernier microbe dans la pathologie des habitants de nos eaux douces.

SIGNIFICATION DE BACILLUS CHLORORAPHIS DANS LES EAUX D'ALIMENTATION

IMBEAUX (1897) considère comme très suspectes les eaux riches en *B. fluorescens liquefaciens* et *B. fl. putridus*. BONJEAN (1899-1906), ayant attiré tout particulièrement l'attention sur la présence de *B. pyocyaneus* dans les eaux d'alimentation, fait remarquer que les infections pyocyaniques à caractère épidémique d'origine hydrique ont été de plus en plus fréquemment observées (MOYNIER et VILLEPOIX, PAPIN, LAUNAY, etc.)

Or, *B. chlororaphis* présente, d'une part de nombreux caractères communs avec les bacilles énumérés plus haut, d'autre part il peut, sous certaines conditions, devenir pathogène pour divers animaux; enfin il a été isolé généralement d'eau douce. Il aurait donc été intéressant d'établir la signification hygiénique de ce bacille dans les eaux d'alimentation. Malheureusement les renseignements statistiques que j'ai pu recueillir sont trop peu nombreux pour permettre une conclusion. Je me bornerai à signaler que M. Ed. BONJEAN (1) le considère plutôt comme un hôte des eaux contaminées. C'est aussi mon avis. Cependant, actuellement, sa présence ne saurait à elle seule jeter un discrédit sur la qualité de l'eau qui le renferme. Pour émettre une opinion exacte sur la signification de ce bacille dans l'eau, il serait nécessaire de connaître son habitat normal et son milieu d'élection, ce que je n'ai pu établir d'une façon précise, faute de documents statistiques.

(1) Communication par lettre.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° La rareté apparente de *B. chlororaphis* peut tenir à ce qu'il a été méconnu lorsqu'un mode de culture peu favorable n'a pas permis l'apparition des cristaux caractéristiques.

2° *Bacillus chlororaphis* se présente sous l'aspect d'un bâtonnet dont la taille diminue à mesure que les cultures vieillissent.

Indépendamment des cellules allongées, on rencontre aussi dans les cultures des cellules rondes.

Bacillus chlororaphis peut, sous l'influence de certains milieux, offrir des formes d'involution différant surtout de la forme normale par la longueur des cellules.

Sous l'action des bases les bâtonnets s'allongent, tandis qu'ils se raccourcissent en présence des acides.

Sur gélose lithinée, la cellule s'entoure d'une auréole hyaline.

3° *Bacillus chlororaphis* est mobile, il possède des flagella polaires au nombre de un à six.

4° Le type de *B. chlororaphis* que j'étudie ne présente pas de spores.

5° *Bacillus chlororaphis* est aérobie. Il est tué par chauffage à 63° C. (dix minutes).

6° *Bacillus chlororaphis* liquéfie la gélatine, coagule le lait et réduit les nitrates en nitrites.

7° Suivant les conditions de cultures *B. chlororaphis* donne une substance soluble fluorescente ou fournit une matière verte cristallisée (*chlororaphine*).

8° La production de la matière fluorescente est influencée par la nature des aliments azoté et carboné, par la proportion relative des aliments azoté, carboné et minéraux entre eux.

9° La formation des cristaux verts est très faible en bouillon peptoné, elle atteint son maximum d'intensité en milieu chimiquement défini (*milieu synthétique type*).

L'oxygène étant indispensable au développement bactérien, les cultures seront faites avec une épaisseur de liquide déterminée.

La température optima est de 25°-30° C.

10° La végétation de *B. chlororaphis* dans un milieu approprié détermine la formation d'une matière soluble, la *xanthoraphine*. Cette substance, très instable, a été obtenue à l'état de cristaux, mais en quantité beaucoup trop faible pour être analysée.

11° Les solutions de *xanthoraphine*, soumises à une action réductrice, laissent précipiter des cristaux verts (*chlororaphine*), à condition que la réduction s'effectue en milieu neutre.

12° Dans les cultures, la précipitation de la *chlororaphine* a lieu au détriment de la *xanthoraphine* et cela grâce à un phénomène de réduction.

13° En présence de l'oxygène, les cristaux verts de *chlororaphine* s'altèrent rapidement en donnant des cristaux jaunes d'*oxychlororaphine*.

14° Les propriétés physiques et chimiques de la *chlororaphine* et de l'*oxychlororaphine* ont été établies, ainsi que la formule de cette dernière :



15° *Bacillus chlororaphis* est pathogène pour la Souris, le Cobaye, la Grenouille, divers Poissons d'eau douce et l'Écrevisse.

Bacillus chlororaphis sécrète des toxines solubles. Il est doué de pouvoir agglutinogène.

Le passage de *B. chlororaphis* par l'organisme souris permet de déterminer une variation expérimentale du pouvoir chromogène de ce microbe.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE ⁽¹⁾

- 1891 ARNAUD (A.) et CHARRIN (A.). — Recherches chimiques sur les sécrétions microbiennes. Transformations et élimination de la matière organique azotée par le B. pyocyannique dans un milieu de culture déterminé. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CXII, p. 755.)
- 1891 ARNAUD (A.) et CHARRIN (A.). — Recherches chimiques et physiologiques sur les sécrétions microbiennes. Transformation et élimination de la matière organique par le B. pyocyannique. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CXII, p. 1157.)
- 1901 *ASCOLI. — Zur Morphologie der Bakterien und ihre Beziehungen zur Virulenz. (*Deutsch. med. Wochenschr.*, n° 20.)
- 1889 BABES. — Ueber isolirt färbbare Antheile von Bakterien. (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. V, 1 planche, p. 173.)
- 1895 BABES. — Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben und Kapselbildung pathogener Bakterien. (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. XX, 2 planches, p. 412.)
- 1903 BABES et RIEGLER. — Ueber eine Fischepidemie bei Bukarest. (*Centralbl. f. Bakter.*, I, Origin., Bd. 33, 1 planche, p. 438.)
- 1909 BAGROS (M.). — Sur le mécanisme de la dénitrification par les Bactéries dénitrifiantes indirectes. (*Thèse Doct. Pharmacie*, Paris.)
- 1909 BAGROS (M.). — Voir GRIMBERT.
- 1907 *BANTA. — The fauna of Mayfield's Cave. (*Publication 67, Carnegie Institution of Washington*.)
- 1907 *BARBER (Marsall A.). — On Heredity in certain Micro-organisms. (*The Kansas Univ. Sc. Bull.*, t. IV, mars 1907, 4 planches, p. 1. — Réf. *Bull. Inst. Pasteur*, t. V, 1907, p. 703.)
- 1893 BATAILLON (E.) et DUBARD. — Sur une maladie de la Truite et des œufs de Truite. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. V, 9^e série, p. 353.)
- 1893 BATAILLON (E.). — Note préliminaire sur la peste des eaux douces. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. V, 9^e série, p. 356.)
- 1894 BATAILLON (E.). — Contribution à l'étude de la peste des eaux douces. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CXVIII, p. 942.)

(1) Le signe (*) marque les travaux dont je n'ai eu connaissance que par des analyses et dont il ne m'a pas été possible de me procurer l'original.

- 1906 *BENIGNETTI (D.) et GINO (G.). — Di una vantaggiosa modificazione al metodo del Pitfield. (*Riv. d'Ig. e. Sani. pub.*, t. XVII, f. 9, pp. 276-279. — Réf. *Bull. Inst. Pasteur*, t. IV, 1906, p. 942.)
- 1899 BERTRAND (G.). — Sur l'emploi de l'acide silicotungstique comme réactif des alcaloïdes. (*Bull. Soc. Chimique*, t. XXI [3^e série], p. 434.)
- 1900 *BEYERINCK (M. W.). — On different forms of hereditary Variation of mikrobcs. (*Kong. Akad. von Wetenschappen te Amsterdam*, 27 Okt. 1900.)
- 1890 BOER (Osc.). — Ueber die Leistungsfähigkeit mehrerer chemischer Desinfectionsmittel bei einigen für den Menschen pathogenen Bakterien. (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. IX, p. 479.)
- 1899 BONJEAN (Ed.). — Le bacille pyocyanique dans les eaux d'alimentation. (*Ann. d'hyg. publique et de méd. lég.*, t. XLII, p. 28.)
- 1906 BONJEAN (Ed.) et OGIER (J.). — Le sol et l'eau. (*Traité d'hygiène*, BROUARDEL et MOSNY, fascicule II, p. 272 et 285; Baillière, Paris.)
- 1898 *BOWHILL (Th.). — Eine neue Methode des Bakterien Geisselfärbung bei Gebrauch einer Orceinbeize. (*Hyg. Rundschau*, n^o 1. Réf. *Centralbl. f. Bakter.*, I, Origin., Bd. XXIII, p. 667.)
- 1908 BURK (Arnold). — Mutation bei einem der Koligruppe verwandten Bakterien. (*Arch. f. Hyg.*, Bd. LXV, p. 235.)
- 1909 BURRI (Robert). — Das Tuscheverfahren als einfaches Mittel zur Lösung einiger schwieriger Aufgaben der Bakterioskopie. (Fischer, Iena, 41 pages, 16 photographies.)
- 1910 BURRI (Robert). — Ueber scheinbar plötzliche Neuerwerbung eines bestimmten Gärungsvermögens durch Bakterien der Coligruppe. (*Centralbl. f. Bakter.*, II. Abt., Bd. XXVIII, p. 321.)
- 1891 *BÜTSCHLI (O.). — Ueber die sogenannten Centralkörper der Zelle und ihre Bedeutung. (*Verhandl. d. Naturhistor. Mediz. Vereins zu Heidelberg*, Neue Folge, Bd. IV, Heft 5, p. 535.)
- 1896 *BÜTSCHLI (O.). — Weitere Ausführungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien. (Leipzig, 1896.)
- 1909 CAPPEZZUOLI (C.). — Voir NEUBERG.
- 1896 CATHELINEAU (H.). — Contribution à l'étude biologique du *Bacillus viridis* de Lesage. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. X, p. 228.)
- 1891 CHARRIN (A.). — Voir ARNAUD.
- 1893 CHARRIN (A.). — L'infection chez les Poissons. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. V, 9^e série, p. 351.)
- 1896 CHARRIN (A.). — Voir GUIGNARD.
- 1896 CHARRIN (A.) et HUGOUNENQ. — Les sécrétions microbiennes. (*Traité de pathologie générale*, BOUCHARD, t. II, p. 248, Masson, Paris.)
- 1910 CROSSONINI (E.) (Gênes). — Ueber den Nachweis von Indol in den bakteriischen Kulturen mit der Erlich'schen Methode. (*Arch. f. Hyg.*, Bd. LXXII, p. 161.)
- 1909 CUÉNOT (L.). — Le peuplement des places vides dans la Nature et l'origine des adaptations. (*Rev. générale des Sciences pures et appliquées*, t. XX, p. 8.)

- 1911 CUÉNOT (L.). — La Genèse des espèces animales. (F. Alcan, Paris, p. 413.)
- 1891 DANGEARD (P. A.). — Contribution à l'étude des Bactériacées vertes. (*Le Botaniste*, 2^e série, 1890-1891, p. 151.)
- 1909 DANGEARD (P. A.). — Note sur deux Bactériacées vertes. (*Bull. de la Soc. Botanique*, t. LVI, p. 323.)
- 1903 *DAVENPORT. — The animal ecology of the Cold Spring sand spit. (*The Decennial publications*, Chicago, t. X, p. 19.)
- 1908 DEMANCHE (Robert). — Voir NONNOTTE.
- 1903 DENIGÈS (G.). — Chimie analytique. (Lyon-Paris, A. Storck, p. 639.)
- 1908 DENIGÈS (G.). — Nouveaux réactifs de l'indol. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXIV, p. 293.)
- 1908 DENIGÈS (G.). — Sur la recherche de l'indol par les réactions de Legal et d'Ehrlich. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXIV, p. 295.)
- 1910 DOBRWOTSKI (K.). — Des microbes producteurs de phénol. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XXIV, p. 595.)
- 1908 DROUIN DE BOUVILLE (R. DE). — Les maladies des Poissons d'eau douce d'Europe. (2^e éd., Berger-Levrault, Paris-Nancy.)
- 1893 DUBARD. — Voir BATAILLON (E.).
- 1894 DUCAMP et PLANCHON. — Note sur un bacille fluorescent et liquéfiant des eaux d'alimentation de Montpellier. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. I, 10^e série, p. 266.)
- 1898 DUCLAUX (E.). — Traité de Microbiologie. (Paris, Masson, t. I, *Microbiologie générale*, pp. 225 à 235, 236, 273; t. III, *Fermentation alcoolique*, 1900, p. 164.)
- 1902 DUFOUR. — Voir PATEIN.
- 1901 *EHRlich. — Ueber die Dimethylamido-Benzaldehyd-Reaktion. (*Med. Woch.*, 1901, n^o 15.)
- 1882 ENGELMANN (Th. W.). — Zur Biologie der Schizomyceten. (*Botanische Zeitung*, n^o 20, p. 320.)
- 1888 ERNST (P.). — Ueber den Bacillus Xerosis und seine Sporenbildung. (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. IV, 1 planche, p. 25.)
- 1889 ERNST (P.). — Ueber Kern- und Sporenbildung in Bakterien (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. V, 2 planches, p. 429.)
- 1902 ERNST (P.). — Ueber den Bau der Bakterien. (*Centralbl. f. Bakter.*, II. Abt., Bd. VIII, 2 planches, p. 1-34-65-97.)
- 1908 ESCALLON (J.) et SICRE (A.). — Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes à l'aide du furfurool. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXV, p. 507.)
- 1876 FITZ (Alb.). — Ueber die Gährung des Glycerins. (*Bericht. d. deutsch. Chem. Gesellschaft*, t. IX, p. 1348.)
- 1876 FITZ (Alb.). — Ueber alkoholische Gährung. (*Ber. d. deutsch. Chem. Gesellschaft*, t. IX, p. 1352.)
- 1877 FITZ (Alb.). — Ueber Schizomyceten Gährungen, II (Glycerin, Mannit, Stärke, Dextrin). (*Ber. d. deutsch. Chem. Gesellschaft*, t. X, p. 276.)
- 1878 FITZ (Alb.). — Ueber Spaltpilzgährungen. (*Ber. d. deutsch. Chem. Gesellschaft*, t. XI, p. 1890.)

- 1880 FITZ (Alb.). — Ueber Spaltpilzgährungen. (*Ber. d. deutsch. Chem. Gesellschaft*, t. XIII, p. 1309.)
- 1882 FITZ (Alb.). — Ueber Spaltpilzgährungen. (*Ber. d. deutsch. Chem. Gesellschaft*, t. XV, p. 867.)
- 1900 FONSECA (A.). — Voir ROCHA.
- 1903 FRIED (E.). — Voir LEHMANN.
- 1894 *GAMALEIA. — Hétéromorphisme des Bactéries sous l'influence des sels de lithium. (*Wratsch.* nos 19 et 20. Réf. *Ann. de Micrographie*, t. VII, 1895, p. 174.)
- 1902 GAMBIER (R.). — Voir MIQUEL.
- 1902 GAUSS (C.-J.). — Babes-Ernst'sche Körperchen und Virulenz bei Bakterien. (*Centralbl. f. Bakter.*, I, Origin., Bd. XXXI, p. 92.)
- 1882 GESSARD (C.). — De la pyocyanine et de son microbe. Colorations qui en dépendent dans les liquides organiques. (*Thèse Fac. méd.*, Paris.)
- 1892 GESSARD (C.). — Sur la fonction fluorescigène des microbes. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. VI, p. 801.)
- 1901 GESSARD (C.). — Variété mélanogène du B. pyocyanique. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XV, p. 817.)
- 1901 GESSARD (C.). — Études sur la tyrosinase. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XV, p. 593.)
- 1902 GESSARD (C.). — Essai sur la biologie du bacille pyocyanique. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XVI, p. 313.)
- 1906 GINO (G.). — Voir BENIGNETTI.
- 1908 GRANSTRÖM-WOSKOBOINIKOW. — Voir LÉVY.
- 1893 GRIMBERT (L.). — Fermentation anaérobie produite par le *Bacillus orthobutylicus*. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. VII, p. 353.)
- 1898 GRIMBERT (L.). — De l'unification des méthodes de culture en Bactériologie. (*Arch. de Parasitologie*, I, n° 2, p. 191.)
- 1899 GRIMBERT (L.). — Action du *B. coli* et du *B. d'Eberth* sur les nitrates. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XIII, p. 67.)
- 1903 GRIMBERT (L.). — Diagnostic des Bactéries par leurs fonctions biochimiques. (*Thèse Fac. méd.*, Paris.)
- 1909 GRIMBERT (L.) et BAGROS (M.). — Sur le mécanisme de la dénitrification chez les bactéries dénitrifiantes indirectes. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXVI, p. 760.)
- 1902 GRIMME (A.). — Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran des Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. (*Marburger Dissertation*, 1902.)
- 1899 GRUSZ. — Ueber die Abhängigkeit der Bildung transitorischer Stärke von der Temperatur und der oxydasischen Wirkung. (*Wochenschr. für Brauerei*, t. XVI, p. 519.)
- 1900 GUÉGEN (F.). — Voir LUTZ.
- 1894 GUIGNARD et SAUVAGEAU. — Sur un nouveau microbe chromogène, le *Bacillus chlororaphis*. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. I, 10^e série, p. 841.)
- 1896 GUIGNARD et CHARRIN (A.). — Notions générales sur les Bactéries. (*Traité de Pathologie générale*, BOUCHARD, t. II, p. 44, Masson, Paris.)

- 1902 GUILLIERMOND (A.). — Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. (*Thèse Doct. Sciences Natur.* Paris.)
- 1905 HANSEN (Em. Chr.). — Oberhefe und Unterhefe. Studien über Variation und Erblichkeit. (*Centralbl. f. Bakt.*, II. Abt., Bd. XV, p. 353.)
- 1904 HOFER (B.). — Handbuch der Fischkrankheiten. (Druck von B. Heller, Munich.)
- 1909 HOLDERER (M.). — Influence de la réaction du milieu sur la filtration des diastases. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CXLIX, p. 1153.)
- 1910 HOLDERER (M.). — Influence de la réaction du milieu sur la filtration de quelques diastases du malt. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CL, p. 285.)
- 1910 HOLDERER (M.). — De la filtration des diastases. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CL, p. 790.)
- 1896 HUGOUNENQ. — Voir CHARRIN.
- 1897 IMBEAUX (Ed.). — Les eaux potables et leur rôle hygiénique dans le département de Meurthe-et-Moselle. (*Thèse Fac. méd. Nancy*, texte, 227 pages, et atlas, p. 134.)
- 1908 *JAGER (L. DE). — Mutatie bij bacterien. (*Nederl. Tijdschr. v. Geneesk.*, f. I, n° 18, 1908. Réf. *Bull. Inst. Pasteur*, t. VI, 1908, p. 859.)
- 1901 JIROU (J.). — Sur les bacilles fluorescents et le pyocyanique. (*Journ. de Physiol. et de Pathologie générale*, t. III, p. 188.)
- 1888 KITASATO. — Ueber das Verhalten der Typhus- und Cholerabacillen zu saure oder alkalihaltigen Nährboden. (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. III, p. 404.)
- 1910 KOWALENKO (A.). — Studien über sogenannte Mutationserscheinungen bei Bakterien unter besonderer Berücksichtigung der Einzelzellkultur. (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. LXVI, p. 277.)
- 1901 KROMPECHER (E.). — Untersuchungen über das Vorkommen metachromatischer Körnchen bei sporentragenden Bakterien, und Beiträge zur Kenntniss der Babes-Ernst'schen Körperchen. (*Centralbl. f. Bakt.*, I, Origin., Bd. XXX, p. 425.)
- 1900 KUNTZ. — Ein Beitrag zur Kenntniss der Bedingungen der Farbstoffbildung des *Bacillus prodigiosus*. (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. XXXIV, p. 169.)
- 1909 LASSEUR (Ph.). — Le *Bacillus chlororaphis* et la chlororaphine. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXVI, p. 272.)
- 1911 LASSEUR (Ph.). — Le *Bacillus chlororaphis*. Influence du fer sur la production de la chlororaphine. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 154.)
- 1911 LASSEUR (Ph.) et MERCIER (L.). — Un Bacille (*Bacillus chlororaphis*) pathogène pour certains animaux d'eau douce. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 889.)
- 1911 LASSEUR (Ph.) et MERCIER (L.). — Variation expérimentale du pouvoir chromogène d'une Bactérie (*Bacillus chlororaphis*). (*C. R. Acad. Sciences*, t. CLII, p. 1415.)
- 1900 LEGROS (G.). — Action des pigments microbiens. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. XLV, p. 900.)

- 1903 LEHMANN (K. B.) et FRIED (E.). — Beobachtungen über die Eigenbewegung der Bakterien. (*Arch. f. Hyg.*, Bd. XLVI, p. 311.)
- 1895 LEPIERRE (Ch.). — Étude d'un bacille fluorescent pathogène. Recherches sur la fonction fluorescigène des microbes. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. IX, p. 643.)
- 1900 LEPIERRE (Ch.). — Voir ROCHA.
- 1888 LESAGE (Ad.). — Du Bacille de la diarrhée verte des enfants du premier âge. (*Arch. de Physiologie*, n° 1, p. 212.)
- 1908 LEVY (E.) et GRANSTRÖM-WOSKOBOINIKOW. — Ueber die Infektion begünstigende, aggressinartige Wirkung der Filtrate junger Bouillonkulturen. (*Centralbl. f. Bakter.*, I, Origin., Bd. XLV, p. 360.)
- 1889-1890 LINOSSIER (G.). — Sur une hématine végétale, l'Aspergilline, pigment des spores de l'*Aspergillus niger*. (*Ann. de Micrographie*, t. III, p. 359.)
- 1891 LINOSSIER (G.). — Sur une hématine végétale : l'Aspergil'ine pigment des spores de l'*Aspergillus niger*. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CXII, p. 489.)
- 1910 LINOSSIER (G.). — Influence du fer sur la formation des spores de l'*Aspergillus niger*. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CLI, p. 1074.)
- 1900 LUTZ (L.) et GUÉGEN (F.). — De l'unification des méthodes de cultures pour la détermination des Mucédinées et des Levures. (*Congrès international de Botanique*, Paris, p. 415.)
- 1904 *MAASSEN (A.). — Die teratologischen Wuchsformen (Involutionenformen) der Bakterien und ihre Bedeutung als diagnostisches Hilfsmittel. (*Arb. a. d. Kais. Gesundh.*, t. XXI, 5 planches, p. 385. Réf. *Bull. Inst. Pasteur*, t. II, 1904, p. 852.)
- 1904 MACÉ (E.). — Traité pratique de Bactériologie. (5^e éd., Baillière, Paris, p. 142 et 1012.)
- 1899 MAQUENNE et ROUX (Eugène). — Observations sur le dosage de l'azote par le procédé de Kjeldahl. (*Bull. de la Soc. Chimique*, t. XXI, 3^e série, p. 312.)
- 1900 MARX (H.) et WOITHE. — Morphologische Untersuchungen zur Biologie der Bakterien. (*Centralbl. f. Bakter.*, I, Origin., Bd. XXVIII, 3 planches, p. 1, 33, 65, 97.)
- 1901 MARX (H.) et WOITHE. — Ein Verfahren zur Virulenzbestimmung der Bakterien. (*Arbeiten aus der Kgl. chirurg. Klinik*. Berlin, Bd. XV.)
- 1907 MASSINI (Rudolf). — Ueber einen in biologischer Beziehung interessanten Kolistamm (*Bacterium coli mutabile*). Ein Beitrag zur Variation bei Bakterien. (*Arch. f. Hyg.*, Bd. LXI, 1 planche, p. 250.)
- 1911 MERCIER (L.) et LASSEUR (Ph.). — Un Bacille (*Bacillus chlororaphis*) pathogène pour certains animaux d'eau douce. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 889.)
- 1911 MERCIER (L.) et LASSEUR (Ph.). — Variation expérimentale du pouvoir chromogène d'une Bactérie (*Bacillus chlororaphis*). (*C. R. Acad. Sciences*, t. CLII, p. 1415.)

- 1904 MEYER (Arth.). — Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. (*Botanische Zeitung*, I. Abt., t. LXII, p. 113.)
- 1883 MIQUEL (P.). — Les organismes vivants de l'atmosphère. (Paris, 0000, p. 292.)
- 1888-1889 MIQUEL (P.). — Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. (*Ann. de Micrographie*, t. I, pp. 414, 470, 506, 552; — t. II, pp. 13, 53, 122, 145, 367, 488.)
- 1889-1890 MIQUEL (P.). — Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. (*Ann. de Micrographie*, t. III, p. 275. — Voir aussi les *Annales*, années 1890-1891, 1891-1892 et 1893.)
- 1902 MIQUEL (P.) et CAMBIER. — Traité de Bactériologie. (Masson, Paris, p. 52 et 836.)
- 1903 MORGAN. — Evolution and Adaptation. (Macmillan, Londres, p. 348.)
- 1909 MÜHLMANN (M.). — Untersuchungen über Dysenterie und verwandte Fragen. Mutationsversuche. (*Arch. f. Hyg.*, Bd. LXIX, p. 401.)
- 1906 NEISSER (M.). — Ein Fall von Mutation nach de Vries bei Bakterien und andere Demonstrationen. (*Centralbl. f. Bakt.*, I., Ref., Bd. XXXVIII, 1 planche, p. 98.)
- 1909 NEUBERG (C.) et CAPPEZZUOLI (C.). — Biochemische Umwandlung von Asparagin und Asparaginsäure in Propionsäure und Bernsteinsäure. (*Biochem. Zeitschr.*, t. XVIII, p. 424.)
- 1895 NICOLLE (M.). — Pratique des colorations microbiennes (méthode de Gram modifiée et méthode directe). (*Ann. Inst. Pasteur*, t. IX, p. 664.)
- 1908 NONNOTTE (Maurice) et DEMANCHE (Robert). — Sur la recherche de l'indol dans les cultures microbiennes. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXIV, p. 494.)
- 1906 OGIER (J.). — Voir BONJEAN.
- 1909 PANISSET (L.). — Voir PORCHER.
- 1910 PANISSET (L.). — Voir PORCHER.
- 1876 PASTEUR (L.). — Études sur la bière. (Gauthier-Villars, Paris, p. 287.)
- 1902 PATEIN et DUFOUR. — De l'emploi du nitrate acide de mercure dans l'analyse des liquides sucrés. (*Journ. de Pharmacie et de Chimie*, p. 221.)
- 1891 PERDRIX (L.). — Sur les fermentations produites par un microbe anaérobie de l'eau. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. V, p. 287.)
- 1894 PLANCHON. — Voir DUCAMP.
- 1909 PORCHER (Ch.) et PANISSET (L.). — Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens. Sa présence dans la culture du choléra des poules. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXVI, p. 624.)
- 1910 PORCHER (Ch.) et PANISSET (L.). — De la recherche de l'indol et de l'hydrogène sulfuré dans les cultures microbiennes. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXVIII, p. 653.)
- 1870 RAULIN (Jules). — Études chimiques sur la végétation. (*Thèse Doct. sciences physiques*, Paris; Masson, Paris, 1905, pp. 183 et 188.)
- 1905 Report of Committee on Standard methods of water analysis, to the

Laboratory section of the American Public Health Association.
(Reprinted from *The Journal of Infectious Diseases*, Supplement
n° 1, May, Chicago.)

- 1903 RIEGLER. — Voir BABES.
- 1900 ROCHA (A.), LEPIERRE (Ch.), FONSECA (A.). — Un cas de fièvre infectieuse simulant la peste pneumonique produite par un bacille fluorescent nouveau. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LII, p. 226.)
- 1899 ROUX (Eugène). — Voir MAQUENNE.
- 1903 RUZICKA (Vladislav). — Ueber die biologische Bedeutung der färbaren Körnchen des Bakterieninhaltes. (*Arch. f. Hyg.*, Bd. XLVI, p. 337.)
- 1903 SAMKOW (S.). — Zur Physiologie des *Bacillus prodigiosus*. (*Centralbl. f. Bakter.*, II. Abt., Bd. XI, p. 305.)
- 1891 SANARELLI (G.). — Ueber einen neuen Mikroorganismus des Wassers welcher für Thiere mit veränderlicher und konstanter Temperatur pathogen ist. (*Centralbl. f. Bakter.*, Bd. IX, p. 193, 222.)
- 1893 SANARELLI (G.). — Les vibrions des eaux et l'étiologie du choléra. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. VII, p. 693.)
- 1910 SAUTON (B.). — Influence du fer sur la formation des spores de l'*Aspergillus niger*. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CLI, p. 241.)
- 1894 SAUVAGEAU. — Voir GUIGNARD.
- 1909 SELTER. — Ueber Indolbildung durch Bakterien. (*Centralbl. f. Bakter.*, I, Origin., Bd. LI, p. 465.)
- 1908 SICRE (A.). — Voir ESCALLON.
- 1909 SICRE (A.). — Sur la recherche de l'indol dans les cultures microbiennes à l'aide des nouveaux réactifs. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXVII, p. 76.)
- 1908 SIMON (J. Didier). — Contribution à l'étude du *Bacillus syncyanus* et de son pigment. (*Thèse Doct. de l'Université de Nancy*, p. 20.)
- 1909 STECKLIN (El. de). — Voir WOLFF.
- 1905 *SULLIVAN (M. X.). — Synthetic culture media and the biochemistry of bacterial pigments. (*Journ. of. medic. Research*, t. XIV, n° 1, novembre, 1905, pp. 109-160. Réf. *Bull. Inst. Pasteur*, t. IV, 1906, p. 354.)
- 1891 TATAROFF (Dimitry). — Die Dorpater Wasserbakterien. (*Inaugural Dissertation, Medicin.*, Dorpat, p. 38.)
- 1900 THIRY (Georges). — Bacille polychrome et *Actinomyces mordoré*. Recherches biologiques sur les bactéries bleues et violettes. Polychromisme. Corps bactériens et cristaux colorés. Matière colorante cristallisée. (Baillière, Paris, pp. 75 et 91.)
- 1880 VAN TIEGHEM (Ph.). — Observations sur des Bactériacées vertes, sur des Phycochromacées blanches et sur les affinités de ces deux familles. (*Bull. de la Soc. Botanique*, t. XXVII, p. 174.)
- 1889 VIGNAL (William). — Contribution à l'étude des Bactériacées (Schizomycètes). Le *Bacillus mesentericus vulgatus*. (Masson, Paris, pp. 20-26.)
- 1876 WITT (Otto-N.). — Zur Kenntniss des Baues und Bildungsfärben der

Kohlenstoffverbindungen. (*Bericht. d. deutschen Chem. Gesellschaft*, t. IX, p. 522.)

1900 WOITHE. — Voir MARX.

1901 WOITHE. — Voir MARX.

1908 WOLFF (J.). — Sur quelques sels minéraux qui peuvent jouer le rôle de peroxydases. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CXLVI, p. 142.)

1908 WOLFF (J.). — Sur quelques peroxydiastases artificielles; du rôle capital du fer dans leur action. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CXLVI, p. 781.)

1909 WOLFF (J.). — Nouvelles analogies entre les oxydases naturelles et artificielles. (*C. R. Acad. Sciences*, t. CXLVIII, p. 946.)

1909 WOLFF (J.). — Observations sur la spécificité dans les phénomènes oxydasiques. Idées nouvelles qu'elles suggèrent relativement au fonctionnement des diastases. (*C. R. Soc. de Biologie*, t. LXVI, p. 842.)

1909 WOLFF (J.) et STÖCKLIN (El. DE). — Contribution à l'étude des enzymes oxydants. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XXIII, p. 841.)

1910 WOLFF (J.). — Relations entre les phénomènes oxydasiques naturels et artificiels. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XXIV, p. 789.)

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Culture sur lait entier âgée de 14 jours (à 25° C). Amas de cristaux de chlororaphine en (c). La caséine (p) précipitée, colorée en jaune rougeâtre, est en voie de peptonisation. La couche crémeuse (g) est colorée en jaune citron.

Les figures suivantes ont été dessinées d'après des préparations fixées à l'alcool-éther et colorées par différentes méthodes. Grossissement : 1.200.

Fig. 2 et 3. — Formes normales de *B. Chlororaphis*.

Fig. 2. — Culture sur gélose peptonée glucosée (à 25° C.) :

- a) Culture de 24 heures. Les bacilles sont allongés et leur cytoplasme est homogène;
- b) Culture de 48 heures. Les bacilles sont de plus petite taille que les précédents;
- c) Éléments vacuolés. Les plus grandes formes proviennent d'une culture de 4 jours et les plus petites d'une culture de 6 jours;
- d) Formes rondes à cytoplasme homogène se rencontrant dans des cultures de tout âge.

Fig. 3. — Culture sur gélose peptonée glucosée, âgée de 24 heures (à 25° C.). Les éléments bactériens, colorés par la méthode de Van Ermengem, présentent des flagella polaires.

Fig. 4, 5, 6, 7, 8, 9. — Formes d'invololution de *B. Chlororaphis*.

Fig. 4. — Culture, sur gélose lithinée, âgée de 4 jours (à 25° C.). Les cellules bactériennes sont entourées d'une auréole hyaline.

Fig. 5. — Culture, sur milieu synthétique type additionné de H_2SO_4 , âgée de 4 jours (à 25° C.). A côté de cellules courtes on voit des éléments de forme carrée, rectangulaire, etc.

Fig. 6. — Culture, sur milieu synthétique type + NH_3 , âgée de 4 jours (à 25° C.). La Bactérie se présente sous la forme de bâtonnets allongés.

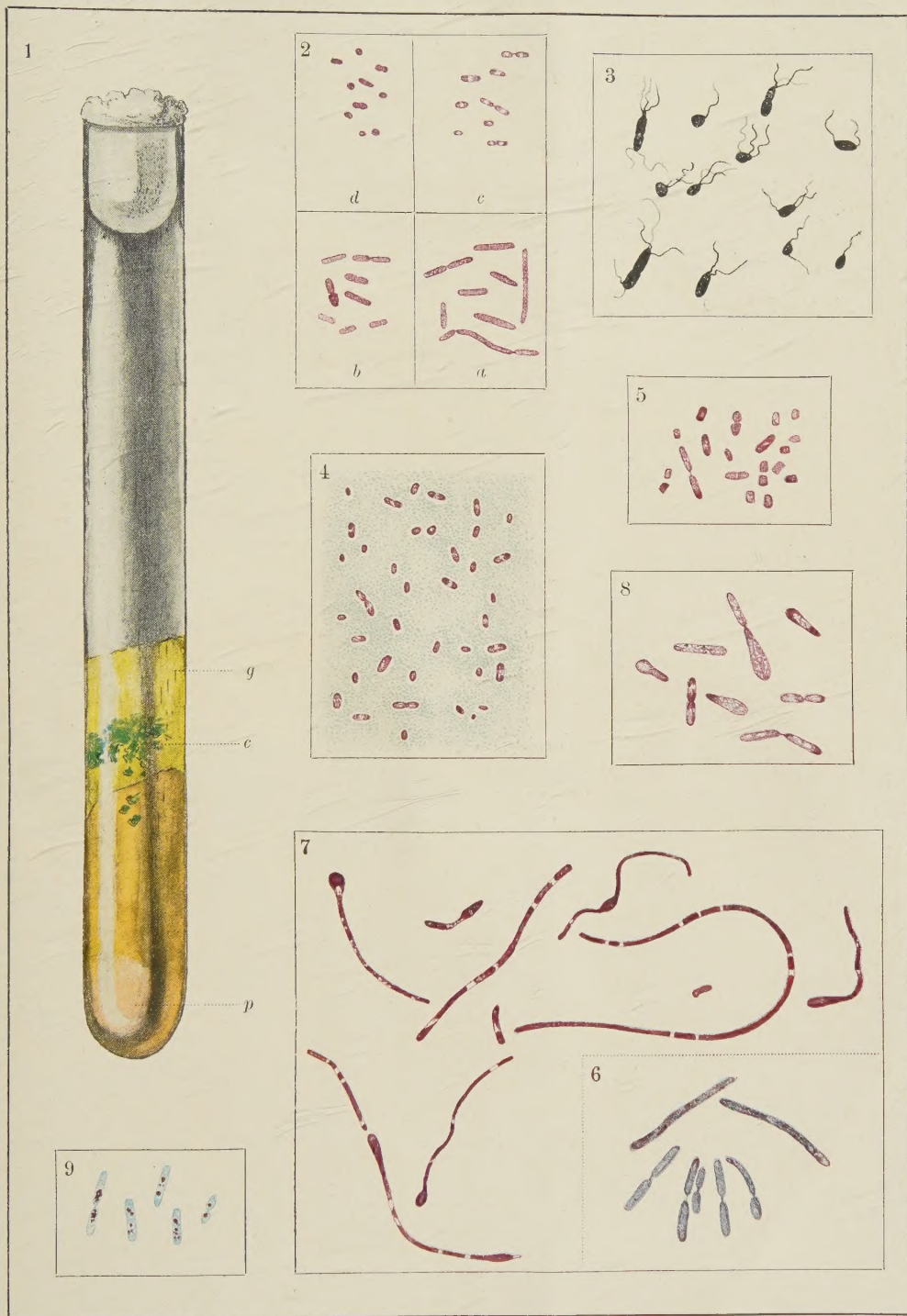
Fig. 7. — Culture, sur milieu aspartique + NH_3 , âgée de 4 jours. Filaments bactériens présentant des renflements. Le cytoplasme est tantôt homogène, tantôt vacuolé.

Fig. 8. — Culture, sur milieu synthétique type + succinate et propionate, âgée de 4 jours (à 25° C.). Formes en massue, à cytoplasme vacuolé.

Fig. 9. — Culture, sur milieu synthétique type, âgée de 3 jours (à 40° C.). Les bacilles allongés présentent des granulations métachromatiques logées dans de petites vacuoles.

BACILLUS CHLORORAPHIS G. ET S.

PH. LASSEUR



SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Zoologie. — La doctrine des anticorps.

Géologie. — Influence de la nature géologique du sol sur la contamination des eaux potables.

VU ET APPROUVÉ :

Nancy, le 29 juin 1911.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. FLOQUET.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Nancy, le 30 juin 1911.

Le Recteur de l'Académie de Nancy,

L. ADAM,

Correspondant de l'Institut.

NANCY, IMPRIMERIE BERGER-LEVRAULT